

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2003年1月30日 (30.01.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/008431 A1

(51) 国際特許分類⁷: C07H 15/12, 5/06, 7/027, C08B 37/00, C12P 13/04, 19/04 (SASAKI, Ken) [JP/JP]; 〒510-0825 三重県 四日市市赤堀新町9番5号 太陽化学株式会社内 Mie (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/06091 (74) 代理人: 細田 芳徳 (HOSODA, Yoshinori); 〒540-6591 大阪府 大阪市 中央区 大手前一丁目 7番 31号 OMM ビル 5階 私書箱 26号 細田国際特許事務所内 Osaka (JP).

(22) 国際出願日: 2002年6月19日 (19.06.2002)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ: 特願2001-185685 2001年6月19日 (19.06.2001) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 大塚化学株式会社 (OTSUKA CHEMICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒540-0021 大阪市 中央区 大手通三丁目 2番 27号 Osaka (JP).

(71) 出願人 および

(72) 発明者: 梶原 康宏 (KAJIWARA, Yasuhiro) [JP/JP]; 〒236-0027 神奈川県 横浜市 金沢区瀬戸 22-2 横浜市立大学大学院総合理学研究科内 Kanagawa (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 佐々木 賢

添付公開書類:
— 国際調査報告書

[続葉有]

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING SUGAR CHAIN ASPARAGINE DERIVATIVE

(54) 発明の名称: 糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法

(57) Abstract: A process for producing a sugar chain asparagine derivative. According to this process, various isolated sugar chain asparagine derivatives which are useful in the field of developing drugs, etc. can be easily obtained in a large amount, compared with the existing processes. A process for producing a sugar chain asparagine via the process for producing a sugar chain asparagine derivative as described above and a process for producing a sugar chain. Novel sugar chain asparagine derivatives, sugar chain asparagines and sugar chains.

(57) 要約:

本発明は、糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法を提供する。該製造方法によれば、医薬品開発等の分野において有用な種々の単離された糖鎖アスパラギン誘導体を従来に比べて非常に容易かつ大量に得ることができる。また本発明は、前記糖鎖アスパラギン誘導体の製造工程を介する、糖鎖アスパラギンの製造方法および糖鎖の製造方法を提供する。さらに本発明は、新規な糖鎖アスパラギン誘導体、糖鎖アスパラギンおよび糖鎖を提供する。

WO 03/008431 A1



2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明細書

糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法

技術分野

本発明は、糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法および糖鎖アスパラギン誘導体に関する。

背景技術

従来、糖鎖を糖加水分解酵素で分解して誘導体化する技術が糖鎖の構造解析など、数ミリグラムスケールの分析研究において利用されている。しかしながら、個々の糖鎖の誘導体を大量に得ることはできなかったため、グラムスケールでの研究技術の進展は遅れていた。そのため、糖鎖の誘導体を、薬品を製造するような合成研究に応用することは難しかった。

一方、卵黄より糖ペプチドが大量に得られることは知られていた (Biochimica et Biophysica Acta 1335 (1997) p23 ~32)。しかしながら、第1図に示す化合物1ならびに該化合物1において分岐糖鎖の一方の非還元末端のシアル酸やガラクトースなど幾つかの糖残基が欠失した一連の化合物についてのフルオレニルメトキシカルボニル (Fmoc) 化された糖鎖の誘導体を大量に得た例はない。また、人の血液中のタンパク質等から幾つかの種類の糖鎖が少量単離された例はあるが、当該糖鎖を薬品の製造に使用すると当該薬品に人体に有害なエイズウイルスや肝炎ウイルス等が混入する危険性があるため、当該糖鎖を薬品に応用する技術は問題視されていた。

ところで、分岐型糖鎖でその分岐部分の構造が同じものと有する糖鎖の製造例は数多くある。その従来技術としては、三種類の方法が存在する。一つ目は、天然に存在する糖タンパク質からアスパラギン結合複合型糖鎖を単離精製する方法

である。その代表例としては、T. Tamura, et al. *Anal. Biochem.*, 1994, 216, p 335-344、V. H. Thomas, et al. *Carbohydr. Res.*, 1998, 306, p387-400、K. G. Rice, et al., *Biochemistry*, 1993, 32, p 7264-7270 などに記載の方法がある。これらの方法の利点は、糖鎖を合成する必要がないということである。しかし、欠点が幾つか存在する。たとえば、前記糖タンパク質由来の糖鎖は、非還元末端部分において糖残基がランダムに幾つか欠失した糖鎖の混合物として得られ、当該混合物に含まれる糖鎖はその物理的・化学的性質が類似しており個々の糖鎖に分離することは非常に困難であるので、单一の糖鎖を大量に得ることは実質的に不可能であった。また、比較的大量に得るために、人血中のタンパク質 (Fibrinogenからの単離: C. H. Hokke, et al, *Carbohydr. Res.*, 305 (1997), p463-468、Human Serum Transferrin からの単離: M. Mizuno et. al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, 121, p284-290) から糖鎖を単離している例がある。前述したように、人血中のタンパク質には、エイズや肝炎ウイルスが混入している可能性があり、操作を慎重に行う必要がある。したがって、得られる糖鎖や、その誘導体を医薬品開発に利用するのは困難である。また、糖鎖が大量に得られたとしても、その構造は限られており、多種類の構造の糖鎖やその誘導体が得られた例は実質的に存在しない。

K. G. Rice, et al., *Biochemistry*, 1993, 32, p7264-7270、あるいはRice, et al., *Neoglycoconjugate*, Academic Press, 1994, ISBN 0-12-440585-1 p286 ~321 では、糖加水分解酵素を用いて糖鎖の非還元末端から糖残基を除去しているが、原料となる単一構造の糖鎖を大量に得ることができないので分析スケールでしか実施できていない。E. Meinjohanns (*J. Chem. Soc. Perkin Transl*, 1998, p549-560) らは、Bovine Fetusin (ウシ由来の糖タンパク質) から第5図に示す化合物56を得た後、第3図に示す化合物33を経由して第1図に示す化合物10を合成している。最初の原料である化合物56を得るためにヒドラジン分解反応を利用している。このヒドラジンは毒性が高く、得られる糖鎖の誘導

体を医薬品に応用する場合、微量のヒドラジンの混入の可能性があるため安全性の点で問題がある。また、シアル酸が結合していない化合物 5' 6'、3' 3 および 1' 0 の糖鎖の誘導体を少量にしか得ることができていない。

二つ目の方法は化学的に糖鎖を合成する方法である。現在、化学合成法により、単糖を組み合わせて 10 糖程度に構築することは、J. Seifert et al. *Angew Chem Int. Ed.* 2000, 39, p531-534 の報告例にあるように可能である。この方法の利点としては、あらゆる糖鎖の誘導体を得ることが理論的には可能なことである。しかし、その工程数が膨大なため、大量合成が困難という欠点がある。また、10 個程度の糖残基が結合した糖鎖を数ミリグラム合成する場合でも、1 年近い期間が必要である。これまでに、幾つかの糖鎖が化学的に合成された例はあるが、その多くが、目的物である糖鎖を数ミリグラム合成できたというのが現状である。

三つ目の方法としては、酵素反応と化学反応を組み合わせて糖鎖を合成する方法である。その代表例としては、Carlo Unverzagt, *Angew Chem Int. Ed.* 1996, 35, p2350-2353 のような報告がある。この方法は、化学的合成によりある程度の糖鎖を構築後、酵素反応により糖残基を糖鎖に付加させ、糖鎖を伸長していく手法である。しかし、糖を伸長する際に用いる酵素に基質特異性があるため、糖鎖に導入できる糖の種類に制限がある。また、化学合成の工程数が膨大なため大量合成が困難で、最終目的物を少量にしか得ることができない。また、C. H. Lin (Bioorganic & Medicinal Chemistry, 1995, p1625-1630) らは、M. Koketsu らが報告した方法 (J. Carbohydrate Chemistry, 1995, 14(6), p833-841) を用いて、卵黄よりシアリルオリゴ糖ペプチドを得、そして、糖加水分解酵素、糖転移酵素を用いて、糖鎖の非還元末端部分の構造の改変を実施している。この論文中の図では、非還元末端部分にアスパラギン (Asn) 残基のみが 1 つ結合したような糖鎖が記載されているが、J. Carbohydrate Chemistry, 1995, 14(6), p833-841 で報告されている方法によれば、糖鎖の非還元末端にアスパラギン以外にリシンなど幾つかのアミノ酸が平均 2.5 個結合したものの混合物が得られる。したが

って、単一化合物として糖鎖の誘導体を得ることはできず、また、分岐型糖鎖の分岐糖鎖の糖残基が任意に欠失した化合物についての個々の誘導体を大量に得ることについての示唆もない。C. H. Linらの論文には、糖鎖ペプチドが単一生成物として得られたという根拠も示されていない。Y. Ichikawa は、Glycopeptide and Related Compounds (Marcel Dekker, Inc., 1997, ISBN 0-8247-9531-8, p. 79 ~ 205) の中で、3分岐型の複合型糖鎖を末端から順次糖加水分解酵素で処理すれば糖鎖の非還元末端から糖鎖を順次除去でき、様々な糖鎖の誘導体が得られるとして述べている。しかしながら、酵素処理後、どのようにして個々の糖鎖を分離するかについては述べられておらず、また、分枝が均一なもののみの合成である。従って、当該方法によっても分岐型糖鎖の分岐糖鎖の糖残基が任意に欠失した化合物についての個々の誘導体を大量に得ることはできないものと考えられる。

発明の開示

本発明は、医薬品開発等の分野において有用な種々の単離された糖鎖アスパラギン誘導体を従来に比べて非常に容易かつ大量に得ることができる、糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法を提供することを目的とする。また本発明は、糖鎖アスパラギン誘導体と共に有用な種々の単離された糖鎖アスパラギンおよび糖鎖をそれぞれ従来に比べて非常に容易かつ大量に得ることができる、糖鎖アスパラギン誘導体を製造する工程を介する、糖鎖アスパラギンの製造方法および糖鎖の製造方法を提供することを目的とする。さらに本発明は、新規な糖鎖アスパラギン誘導体、糖鎖アスパラギンおよび糖鎖を提供することを目的とする。

すなわち、本発明は、

(1) (a) 1種もしくは2種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物に含まれる該糖鎖アスパラギンに脂溶性の保護基を導入して糖鎖アスパラギン誘導体混合物を得る工程、

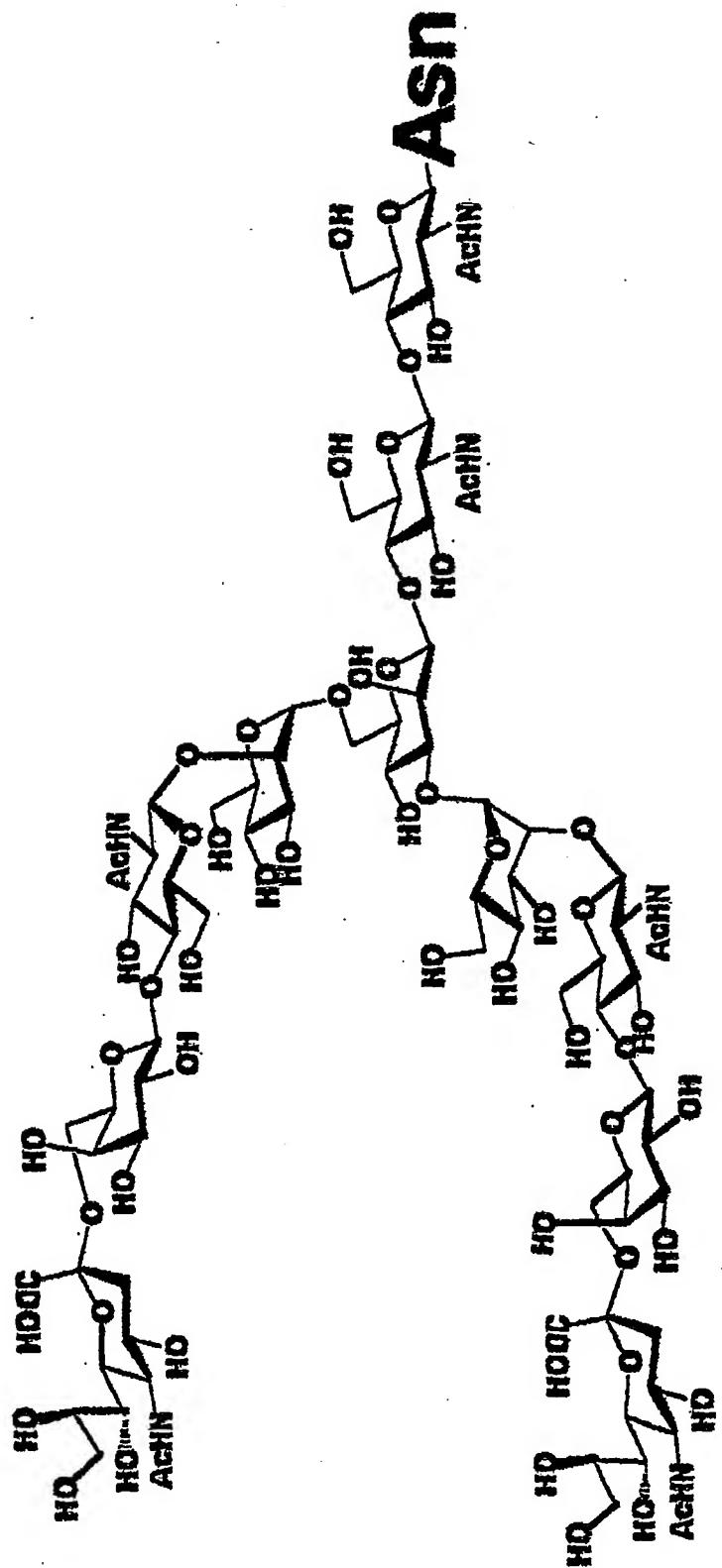
ならびに

(b) 該糖鎖アスパラギン誘導体混合物または該糖鎖アスパラギン誘導体混合物に含まれる糖鎖アスパラギン誘導体を加水分解して得られる混合物をクロマトグラフィーに供して各糖鎖アスパラギン誘導体を分離する工程、

を含む、糖鎖アスパラギン由来の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法、

(2) (b') 工程 (b) で分離された糖鎖アスパラギン誘導体を糖加水分解酵素を用いて加水分解する工程をさらに含む前記 (1) 記載の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法、

(3) 1種もしくは2種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物が、



および／または該化合物において1以上の糖残基が欠失した化合物を含むものである、前記(1)または(2)記載の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法、

(4) 脂溶性の保護基がフルオレニルメトキシカルボニル(Fmoc)基である前記(1)～(3)いずれか記載の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法、

(5) 工程(a)が、非還元末端にシアル酸残基を有する1種もしくは2種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物に含まれる該糖鎖アスパラギンにFmoc基を導入し、かつシアル酸残基にベンジル基を導入して糖鎖アスパラギン誘導体混合物を得る工程である、前記(1)～(3)いずれか記載の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法、

(6) (a) 1種もしくは2種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物に含まれる該糖鎖アスパラギンに脂溶性の保護基を導入して糖鎖アスパラギン誘導体混合物を得る工程、

(b) 該糖鎖アスパラギン誘導体混合物または該糖鎖アスパラギン誘導体混合物に含まれる糖鎖アスパラギン誘導体を加水分解して得られる混合物をクロマトグラフィーに供して各糖鎖アスパラギン誘導体を分離する工程、ならびに

(c) 工程 (b) で分離された糖鎖アスパラギン誘導体の保護基を除去して糖鎖アスパラギンを得る工程、

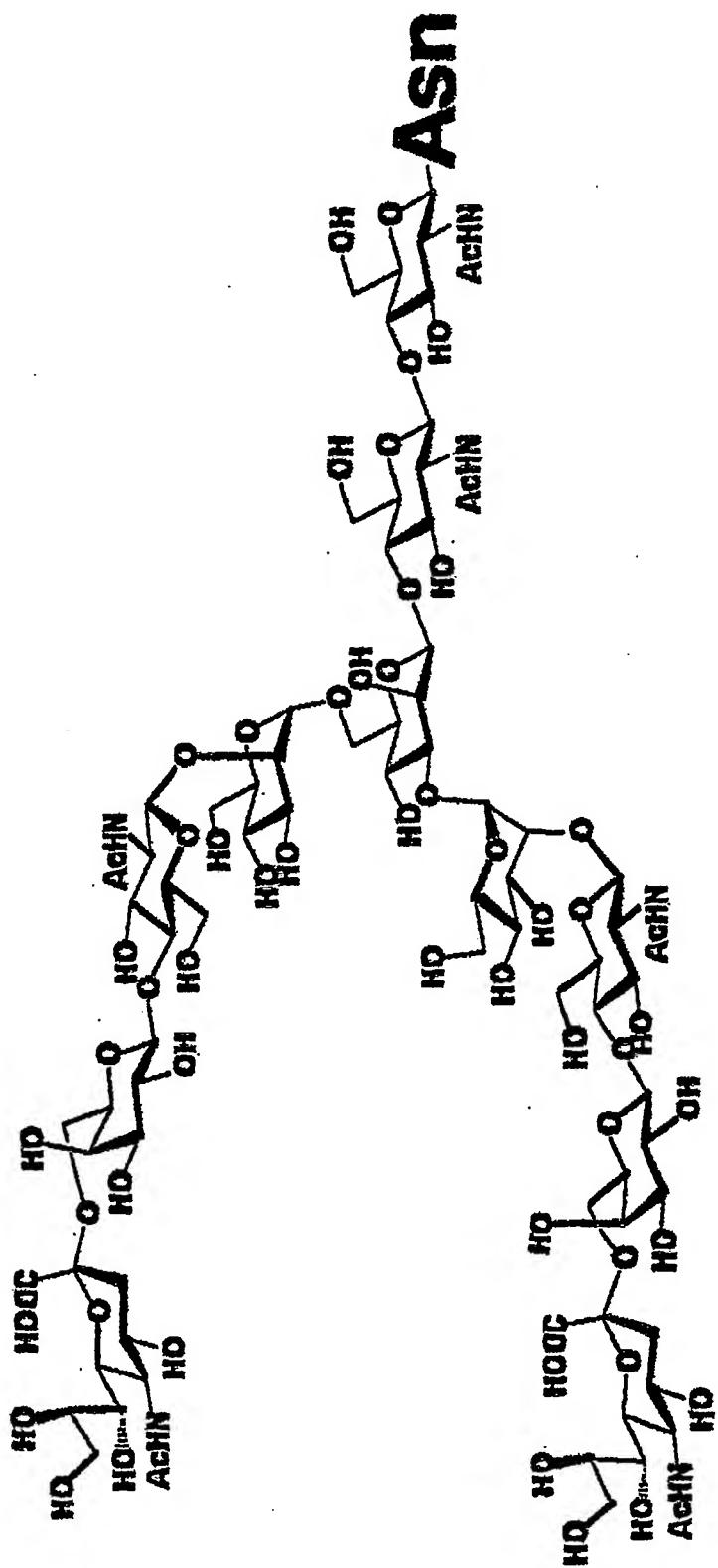
を含む、糖鎖アスパラギンの製造方法、

(7) (b') 工程 (b) で分離された糖鎖アスパラギン誘導体を糖加水分解酵素を用いて加水分解する工程、および／または

(c') 工程 (c) で得られた糖鎖アスパラギンを糖加水分解酵素を用いて加水分解する工程、

をさらに含む、前記 (6) 記載の糖鎖アスパラギンの製造方法、

(8) 1種もしくは2種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物が、



および／または該化合物において1以上の糖残基が欠失した化合物を含むものである、前記(6)または(7)記載の糖鎖アスパラギンの製造方法、

(9) 脂溶性の保護基がFmoc基である前記(6)～(8)いずれか記載の糖鎖アスパラギンの製造方法、

(10) 工程(a)が、非還元末端にシアル酸残基を有する1種もしくは2種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物に含まれる該糖鎖アスパラギンにFmoc基を導入し、かつシアル酸残基にベンジル基を導入して糖鎖アスパラギン誘導体混合物を得る工程である、前記(6)～(8)いずれか記載の糖鎖アスパラギン

の製造方法、

(11) (a) 1種もしくは2種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物に含まれる該糖鎖アスパラギンに脂溶性の保護基を導入して糖鎖アスパラギン誘導体混合物を得る工程、

(b) 該糖鎖アスパラギン誘導体混合物または該糖鎖アスパラギン誘導体混合物に含まれる糖鎖アスパラギン誘導体を加水分解して得られる混合物をクロマトグラフィーに供して各糖鎖アスパラギン誘導体を分離する工程、

(c) 工程 (b) で分離された糖鎖アスパラギン誘導体の保護基を除去して糖鎖アスパラギンを得る工程、ならびに

(d) 工程 (c) で得られた糖鎖アスパラギンのアスパラギン残基を除去して糖鎖を得る工程、

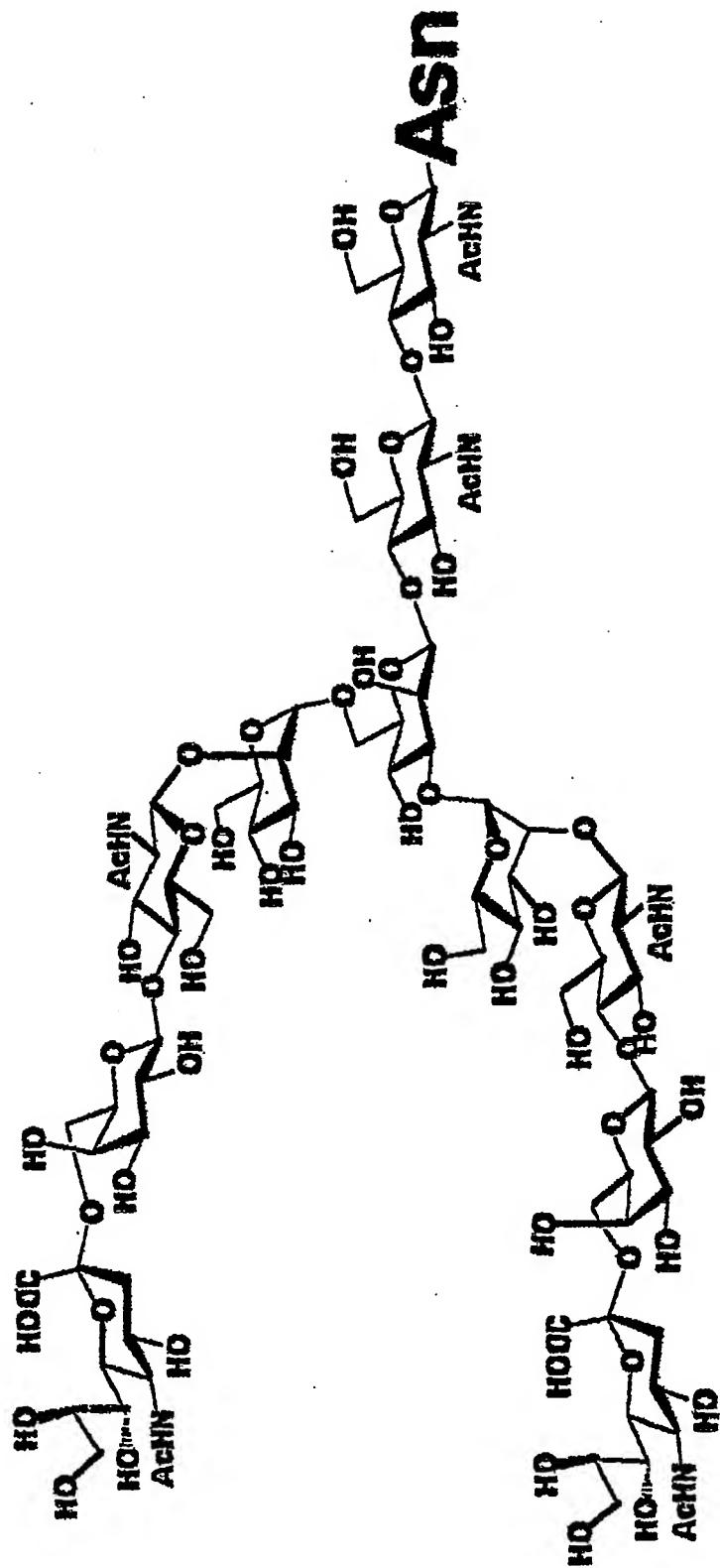
を含む、糖鎖の製造方法、

(12) (b') 工程 (b) で分離された糖鎖アスパラギン誘導体を糖加水分解酵素を用いて加水分解する工程、および／または

(c') 工程 (c) で得られた糖鎖アスパラギンを糖加水分解酵素を用いて加水分解する工程、および／または

(d') 工程 (d) で得られた糖鎖を糖加水分解酵素を用いて加水分解する工程、をさらに含む、前記 (11) 記載の糖鎖の製造方法、

(13) 1種もしくは2種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物が、



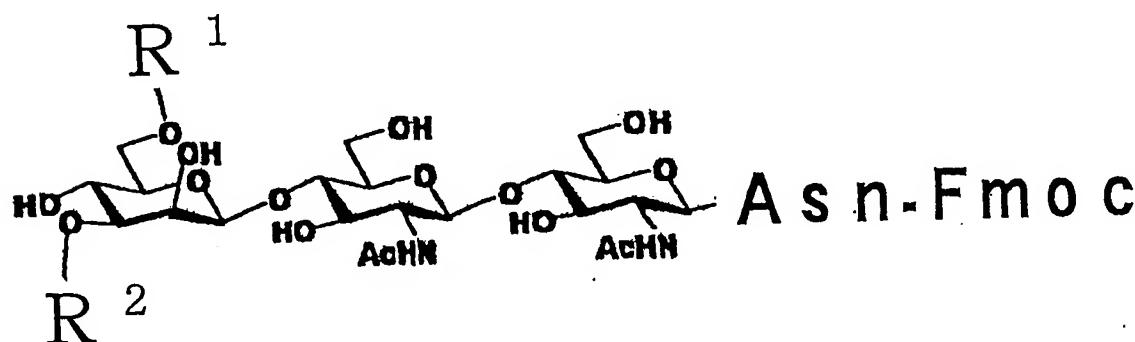
および／または該化合物において1以上の糖残基が欠失した化合物を含むもので

ある、前記（11）または（12）記載の糖鎖の製造方法、

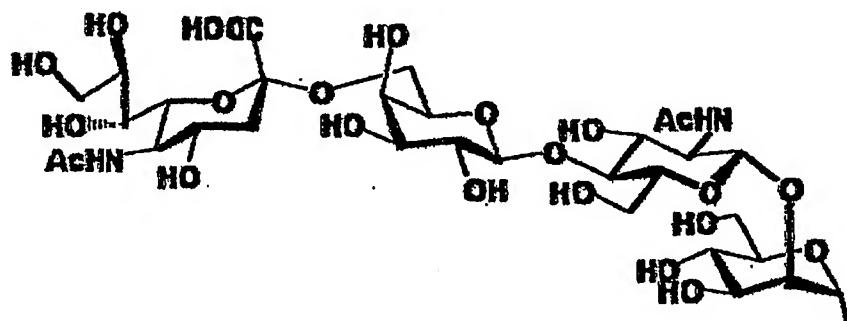
（14） 脂溶性の保護基がFmoc基である前記（11）～（13）いずれか記載の糖鎖の製造方法、

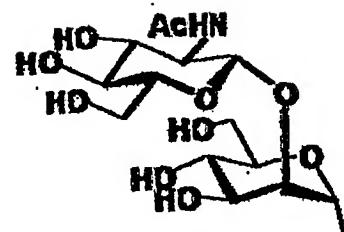
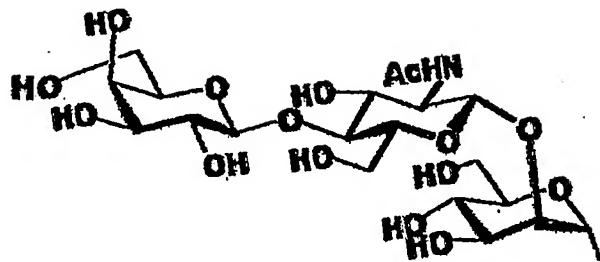
（15） 工程（a）が、非還元末端にシアル酸残基を有する1種もしくは2種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物に含まれる該糖鎖アスパラギンにFmoc基を導入し、かつシアル酸残基にベンジル基を導入して糖鎖アスパラギン誘導体混合物を得る工程である、前記（11）～（13）いずれか記載の糖鎖の製造方法、

（16） 一般式：

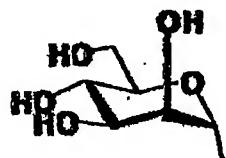


（式中、R¹ およびR² は、H、



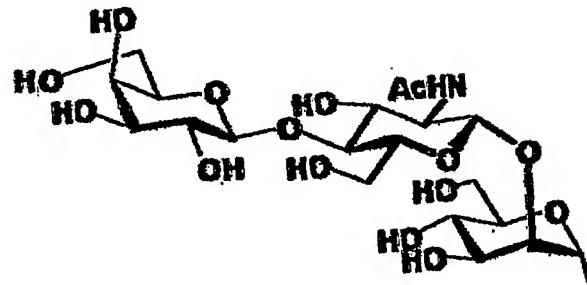


または



であり、同一でも異なっていてもよい。ただし、

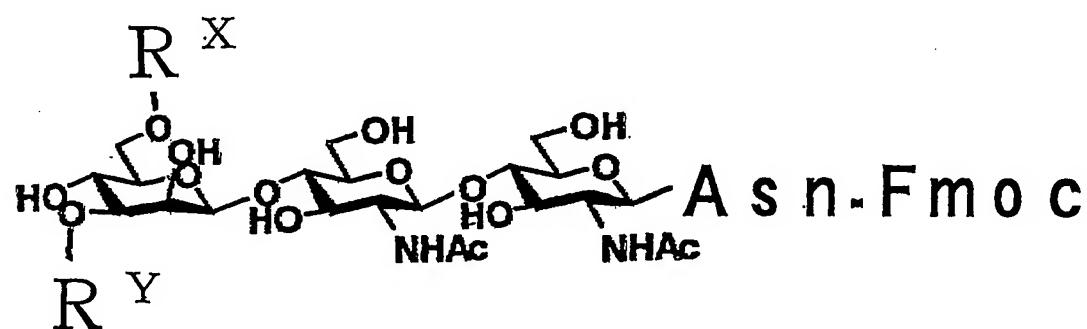
R^1 および R^2 が共に



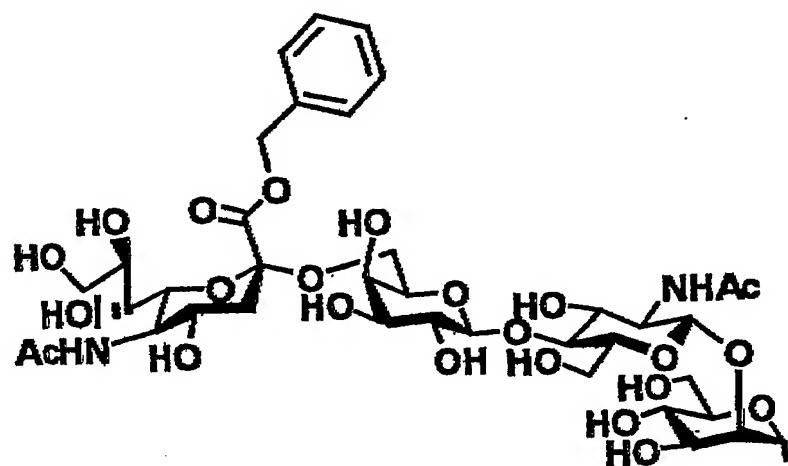
である場合を除く。)

を有する糖鎖アスパラギン誘導体、

(17) 一般式：

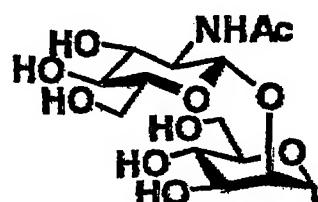
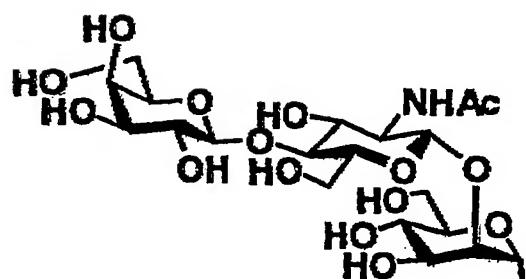
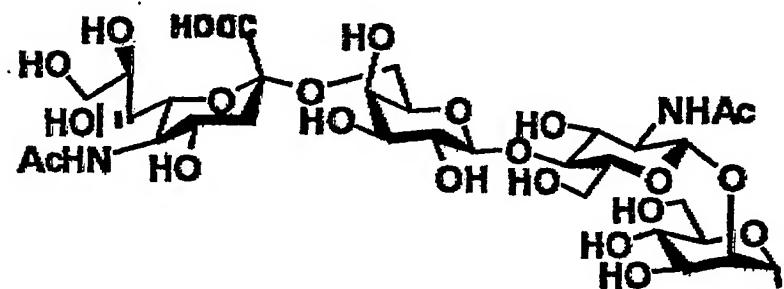
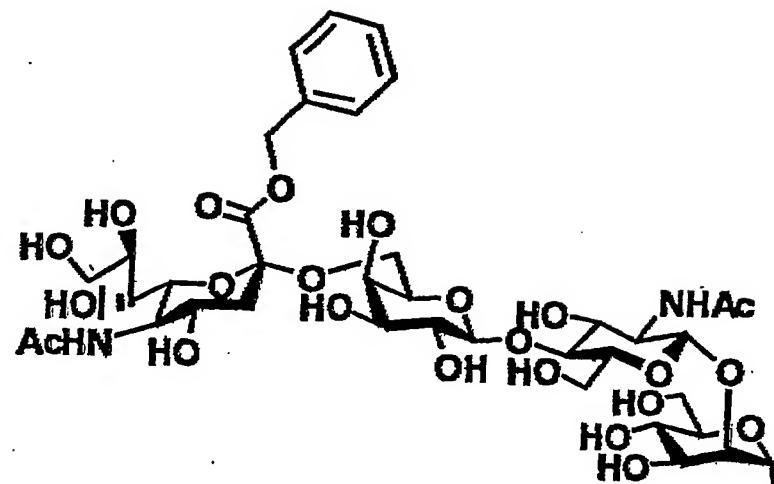


(式中、 R^X および R^Y は、一方が

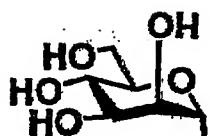


であり、

他方が、H、



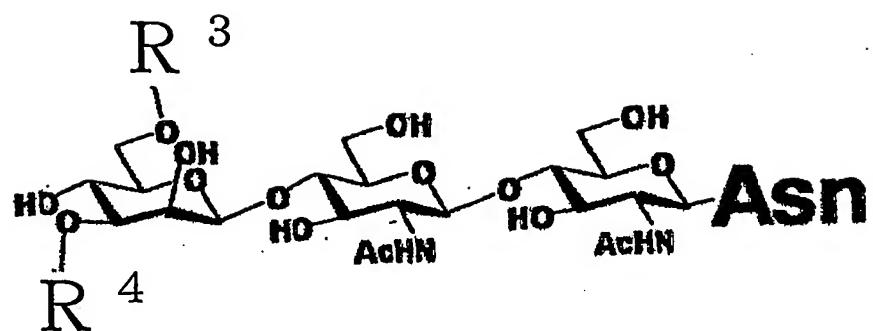
または



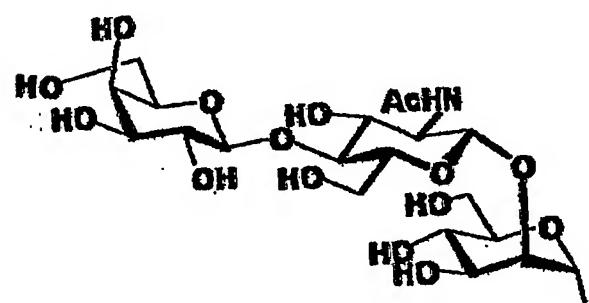
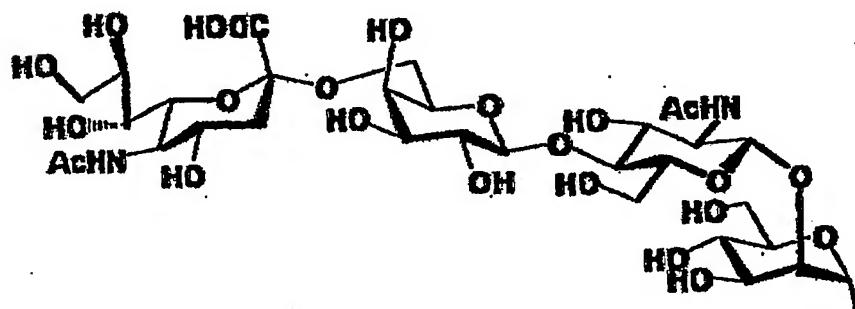
である。)

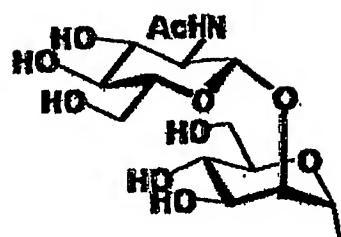
を有する糖鎖アスパラギン誘導体、

(18) 一般式：

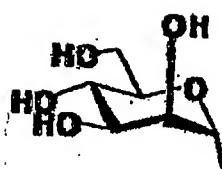


(式中、R³ およびR⁴ は、H、



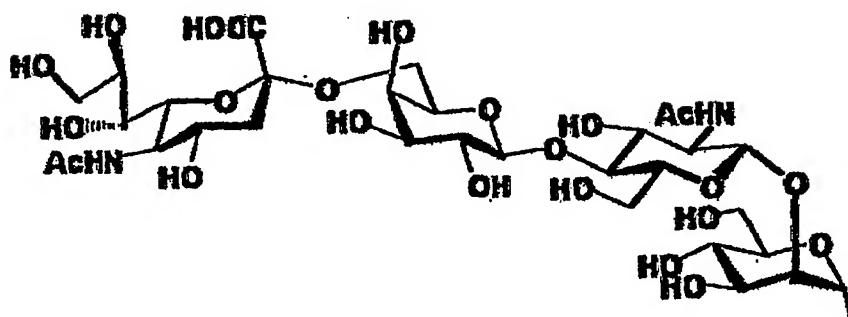


または

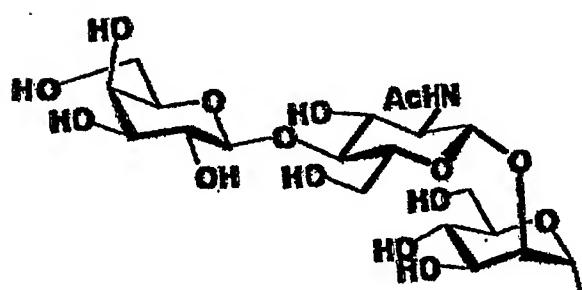


であり、

同一でも異なっていてもよい。ただし、 R^3 および R^4 が共に



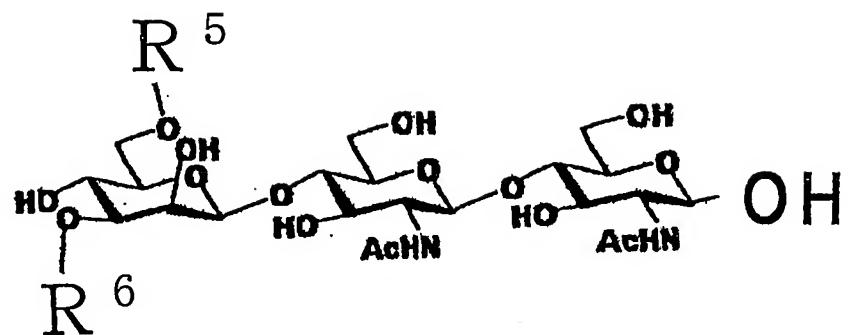
または



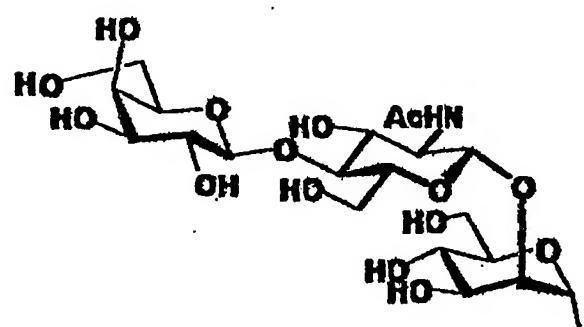
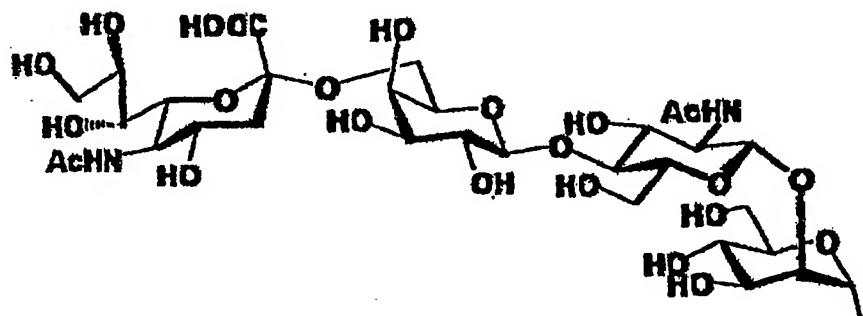
である場合を除く。)

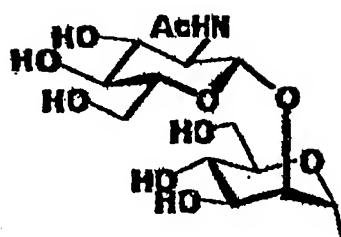
を有する糖鎖アスパラギン、ならびに

(19) 一般式：

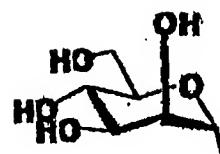


(式中、R⁵ および R⁶ は、H、



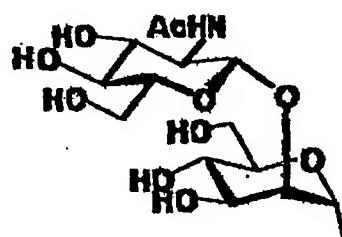
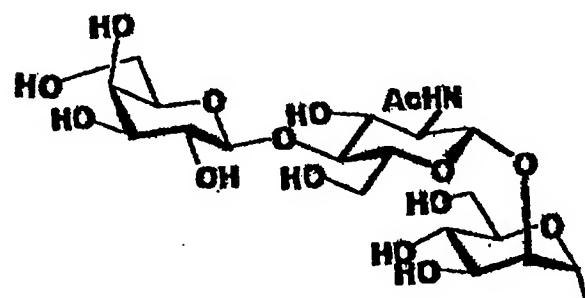
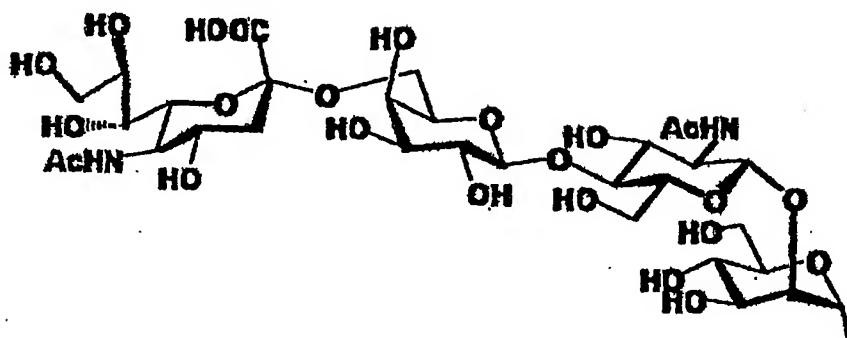


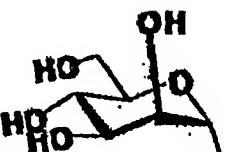
または

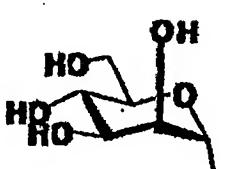


であり、

同一でも異なっていてもよい。ただし、R⁵ および R⁶ が共に



または  であるか、あるいは R^5 または R^6 の一方がHであり、

かつ他方が  である場合を除く。)

を有する糖鎖、
に関する。

図面の簡単な説明

第1図は、本発明により得られ得る糖鎖アスパラギン誘導体の一群の構造を示す図である。

第2図は、本発明により得られ得る糖鎖アスパラギン誘導体の一群の構造を示す図である。

第3図は、本発明により得られ得る糖鎖アスパラギンの一群の構造を示す図である。

第4図は、本発明により得られ得る糖鎖アスパラギンの一群の構造を示す図である。

第5図は、本発明により得られ得る糖鎖の一群の構造を示す図である。

第6図は、本発明により得られ得る糖鎖の一群の構造を示す図である。

第7図は、本発明の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法における工程の一例を示す図である。

第8図は、種々の糖加水分解酵素を用いた糖鎖アスパラギン誘導体の変換工程の一例を示す図である。

第9図は、種々の糖加水分解酵素を用いた糖鎖アスパラギン誘導体の変換工程の一例を示す図である。

第10図は、種々の糖加水分解酵素を用いた糖鎖アスパラギン誘導体の変換工程の一例を示す図である。

第11図は、種々の糖加水分解酵素を用いた糖鎖アスパラギン誘導体の変換工程の一例を示す図である。

第12図は、糖鎖アスパラギン誘導体からの保護基（Fmoc基）の除去工程および糖鎖アスパラギンからのアスパラギン残基の除去工程の一例を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法は、たとえば、天然の糖タンパク質に由来する糖鎖アスパラギン、好ましくはアスパラギン結合型糖鎖から得られる糖鎖アスパラギンの混合物に含まれる当該糖鎖アスパラギンに脂溶性の保護基

を導入（結合）して糖鎖アスパラギン誘導体の混合物を得た後に当該混合物を各糖鎖アスパラギン誘導体に分離することを1つの大きな特徴とする。なお、本明細書において、「糖鎖アスパラギン」とはアスパラギンが結合した状態の糖鎖をいう。また、「アスパラギン結合型糖鎖」とはタンパク質のポリペプチド中のアスパラギン（Asn）の酸アミノ基に、還元末端に存在するN-アセチルグルコサミンがN-グリコシド結合した糖鎖群であって、Man_(β1-4)GlcNAc_(β1-4)GlcNAcを母核とする糖鎖群をいう。「糖鎖アスパラギン誘導体」とはアスパラギン残基に脂溶性の保護基が結合した状態の糖鎖アスパラギンをいう。また、化合物の構造式中、「AcHN」はアセトアミド基を示す。

前記するように、天然の糖タンパク質に由来する糖鎖は非還元末端の糖残基がランダムに欠失した糖鎖の混合物である。本発明者らは、意外にも天然の糖タンパク質に由来する糖鎖、具体的には糖鎖アスパラギンの混合物に含まれる当該糖鎖アスパラギンに脂溶性の保護基を導入することで、当該保護基が導入された糖鎖アスパラギン誘導体の混合物を公知のクロマトグラフィーの手法を用いて容易に個々の糖鎖アスパラギン誘導体に分離することができることを見出した。それにより、種々の構造を有する糖鎖アスパラギン誘導体をそれぞれ大量に調製することができた。たとえば、従来分離が困難であった、第1図に示す化合物2と6または第2図に示す化合物3と7のような似た構造の糖鎖アスパラギン誘導体同士の分離が可能となり、それらの化合物を各々、容易かつ大量に調製することができる。また、得られた糖鎖アスパラギン誘導体を元に、たとえば、糖加水分解酵素を順次作用させて糖残基を除去することにより、さらに様々な糖鎖アスパラギン誘導体を合成することもできる。

このように、糖鎖アスパラギンに脂溶性の保護基を導入して誘導体化することにより個々の糖鎖アスパラギン誘導体の分離が可能となったが、これは、脂溶性の保護基を導入したことにより糖鎖アスパラギン誘導体の全体の脂溶性が高まり、たとえば、好適に使用される逆相系カラムとの相互作用が格段に向上し、その結

果、より鋭敏に糖鎖構造の差を反映して個々の糖鎖アスパラギン誘導体が分離されるようになったことによると考えられる。たとえば、本発明において好適に使用される脂溶性の保護基である Fmoc 基の脂溶性は非常に高い。すなわち、Fmoc 基のフルオレニル骨格は、中心の五員環にベンゼン環が 2 つ結合した非常に脂溶性の高い性質の構造をとっており、たとえば、逆相系カラムの 1 つである ODS カラムのオクタデシル基と非常に強い相互作用を生み、似た構造の糖鎖アスパラギン誘導体の分離が可能になったものと考えられる。

さらに本発明によれば、後述するように、得られた糖鎖アスパラギン誘導体の保護基を除去することにより種々の糖鎖アスパラギンを、また、得られた糖鎖アスパラギンのアスパラギン残基を除去することにより種々の糖鎖を、容易かつ大量に得ることができる。

本発明の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法は、具体的には、

(a) 1 種もしくは 2 種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物に含まれる該糖鎖アスパラギンに脂溶性の保護基を導入して糖鎖アスパラギン誘導体混合物を得る工程、ならびに

(b) 該糖鎖アスパラギン誘導体混合物または該糖鎖アスパラギン誘導体混合物に含まれる糖鎖アスパラギン誘導体を加水分解して得られる混合物をクロマトグラフィーに供して各糖鎖アスパラギン誘導体を分離する工程、
を含むものである。

工程 (a) において使用される 1 種もしくは 2 種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物としては、アスパラギンの結合した状態の糖鎖を 1 種もしくは 2 種以上含む混合物であれば特に限定されるものではない。たとえば、アスパラギンが 1 または複数個結合した糖鎖を 1 種もしくは 2 種以上含む混合物であってもよい。中でも、入手の容易性の観点から、還元末端にアスパラギンが結合した糖鎖を 1 種もしくは 2 種以上含む混合物が好適である。なお、本明細書において「糖鎖」とは、任意の単糖が 2 以上結合したものをいう。

かかる糖鎖アスパラギンの混合物は、公知の方法により、好ましくは天然の原料、たとえば、乳汁、ウシ由来フュチュインまたは卵から糖タンパク質および／または糖ペプチドの混合物を得、当該混合物に、たとえば、タンパク質分解酵素、たとえば、プロナーゼ（和光純薬社製）、アクチナーゼ-E（科研製薬社製）や、一般のカルボキシペプチダーゼ、アミノペプチダーゼなどの酵素を添加して、公知の反応条件下に反応を行ってペプチド部分を切断し、当該反応後の反応液として、または反応液より糖鎖アスパラギン以外の成分を公知の方法、たとえば、ゲル濾過カラム、イオン交換カラムなどを用いた各種クロマトグラフィーや、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いた精製法に従って除去することにより、得ることができる。調製の容易性の観点から、公知の卵由来の糖ペプチド〔Biochimica et Biophysica Acta 1335 (1997) p23 ~32；粗精製SGP（卵黄中のタンパク質、無機塩等を含み、糖ペプチドが10～80重量%程度含まれる混合物）〕を使用して前記混合物を調製するのが好ましい。

また、所望の糖鎖構造を有する糖鎖アスパラギン誘導体を効率的に得るという観点から、さらに当該混合物に含まれる糖鎖アスパラギンを加水分解して一部糖残基を予め切断しておくのが好ましい。なお、当該切断の程度は、少なくとも本明細書にいう「糖鎖」としての構造を保持する範囲内であれば特に限定されるものではない。このようにして得られる混合物としては、たとえば、第3図に示す化合物24および／または該化合物において1以上の糖残基が欠失した化合物を含む混合物をあげることができる。なお、かかる場合、該糖残基が欠失した化合物が、本明細書にいう「糖鎖」の構造を保持する観点から、糖残基の欠失は上限で9である。

たとえば、第3図に示す化合物25および29は、化合物24を含む糖鎖アスパラギンの混合物（以下、化合物24混合物という）を以下のようにして酸加水分解することにより当該混合物中に効率的に得られ、延いては対応する糖鎖アスパラギン誘導体である第1図に示す化合物2および6を効率的に得ることができ

る。

たとえば、化合物24混合物に対し0.1規定程度の酸水溶液を適量加え、たとえば、4～100℃にて反応を行う。その際、加水分解反応の進行を薄層クロマトグラフィー（たとえば、シリカゲル60F254（メルク社製）と、展開溶媒として酢酸エチル：メタノール：水=4：4：3を用いる）で追跡しながら、化合物25および29が最も多く得られるところで反応を停止させる。たとえば、25℃の条件では5～10時間程度で、100℃の条件では数分程度で反応を停止させればよい。好ましくは、70℃で反応を行い、反応開始後、35分で反応を停止させて速やかに氷冷する。なお、反応は、反応液を中和することで停止させることができる。また、前記酸としては特に限定するものではなく、たとえば、塩酸、硫酸、硝酸、トリフルオロ酢酸などの無機酸および有機酸、陽イオン交換樹脂、不溶性の固体試薬などを使用することができる。

同様に、化合物24から化合物33を前記混合物中に効率的に得ることもできる。たとえば、化合物24混合物に対し前記酸水溶液を適量加え、好ましくは80℃で反応を行い、反応開始後、好ましくは60分で反応を停止させる。

また、加水分解は酵素的に行うこと也可以ある。その際に用い得る酵素としては、糖加水分解酵素が好適であり、エンド型、エキソ型いずれの反応様式の酵素も使用することができる。たとえば、前記同様、化合物24から化合物25および29を得る場合、シアル酸を末端より切断する活性を有するシアル酸加水分解酵素を使用することができる。かかる酵素としては特に限定されるものではなく、当該活性を有するものであれば、市販の酵素、新たに単離された酵素、遺伝子工学的に創製された酵素であってもよい。酵素反応は公知の条件に従えば良く、その際、前記同様に反応の進行を薄層クロマトグラフィーで追跡し、化合物25および29がもっとも多く得られるところで反応を適宜停止させればよい。

以上のようにして得られた糖鎖アスパラギンを含む混合物を用い、それに含まれる糖鎖アスパラギンに脂溶性の保護基の導入を行う。当該保護基としては特に

限定されるものではなく、たとえば、Fmoc基やt-ブチルオキシカルボニル(Boc)基、ベンジル基、アリル基、アリルオキシカーボネート基、アセチル基などの、カーボネート系またはアミド系の保護基などを使用することができる。得られた糖鎖アスパラギン誘導体を直ちに所望の糖ペプチドの合成に使用できるという観点から、当該保護基としては、Fmoc基またはBoc基などが好ましく、Fmoc基がより好ましい。Fmoc基はシアル酸など比較的酸性条件に不安定な糖が糖鎖に存在する場合に特に有効である。また、保護基の導入は公知の方法（たとえば、Protecting groups in Organic chemistry, John Wiley & Sons INC., New York 1991, ISBN 0-471-62301-6を参照）に従って行えばよい。

たとえば、Fmoc基を用いる場合、糖鎖アスパラギンを含む混合物に対しアセトンを適量加えた後、さらに9-フルオレニルメチル-N-スクシニミチルカーボネートと炭酸水素ナトリウムを加えて溶解し、25℃にてアスパラギン残基へのFmoc基の結合反応を行うことにより、当該糖鎖アスパラギンのアスパラギン残基にFmoc基を導入することができる。

以上の操作により、脂溶性の保護基が導入された糖鎖アスパラギン誘導体の混合物が得られる。

次いで、工程（b）において糖鎖アスパラギン誘導体混合物を公知のクロマトグラフィー、特に分取型のクロマトグラフィーに供して各糖鎖アスパラギン誘導体に分離する。なお、かかる工程においては、前記工程（a）において得られた糖鎖アスパラギン誘導体混合物を直接使用することができるが、所望の糖鎖構造を有する糖鎖アスパラギン誘導体を効率的に得るという観点から、さらに当該混合物に含まれる糖鎖アスパラギン誘導体を加水分解に供し一部糖残基を予め切断して得られる糖鎖アスパラギン誘導体の混合物を使用してもよい。なお、糖残基の切断の程度は前記同様である。また、加水分解は前記と同様にして行うことができる。

たとえば、化合物3および7を得る場合、化合物2および6との混合物からそ

これらを分離するよりも、当該混合物をガラクトース加水分解酵素を用いる加水分解処理に供することにより、得られた混合物から化合物3および7をHPLCでさらに容易に分離でき、かつ大量にそれぞれの化合物を单一化合物として大量に得られる。

各糖鎖アスパラギン誘導体のクロマトグラフィーによる分離は、適宜、公知のクロマトグラフィーを単独でまたは複数組み合わせて用いることにより行うことができる。

たとえば、得られた糖鎖アスパラギン誘導体混合物をゲルfiltrationカラムクロマトグラフィーで精製後、HPLCを用いて精製する。HPLCにおいて用い得るカラムとしては逆相系のカラムが好適であり、たとえば、ODS、Phenyl系、ニトリル系や、陰イオン交換系のカラム、具体的には、たとえば、ファルマシア社製モノQカラム、イヤトロン社製イアトロビーズカラムなどが利用可能である。分離条件等は適宜、公知の条件を参考して調整すればよい。以上の操作により、糖鎖アスパラギン誘導体混合物から所望の各糖鎖アスパラギン誘導体を得ることができる。第7図に本発明の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法における工程の一例を模式的に示す。

さらに、工程(b)で分離された糖鎖アスパラギン誘導体を加水分解することにより、所望の糖鎖構造を有する糖鎖アスパラギン誘導体を効率的に得ることができる〔工程(b')〕。たとえば、糖鎖アスパラギン誘導体を分離する段階においては混合物に含まれる糖鎖アスパラギン誘導体の種類を制限して糖鎖アスパラギン誘導体を大まかに分離し、次いで加水分解、たとえば、糖加水分解酵素を用いて加水分解することにより所望の糖鎖構造を有する糖鎖アスパラギン誘導体を効率的に得ることができる。なお、加水分解は前記と同様にして行うことができる。特に、所望の糖鎖構造を有する糖鎖アスパラギン誘導体をより効率的に得る観点から、糖残基の切断様式が明確な糖加水分解酵素を用いて加水分解するのが好ましい。

たとえば、ガラクトース残基の除去による化合物2と6の化合物3と7への変換（第8図）は、化合物2と6を緩衝液（たとえば、リン酸緩衝溶液、酢酸緩衝溶液、グッド緩衝溶液など）に溶かし、公知の条件に従ってガラクトース加水分解酵素を用いてガラクトース残基の切断反応を行うことにより成し得る。なお、化合物2と6は、それらの混合物であっても、各々単離されたものであってもよい。この反応で用いるガラクトース加水分解酵素は市販されている公知のエキソ型の酵素を利用するのが好ましい。また、同様の活性を有するものであれば、新たに単離された酵素、遺伝子工学的に創製された酵素であってもよい。次いで、前記と同様にして、反応後に得られる反応液（糖残基が切断された糖鎖アスパラギン誘導体の混合物）をクロマトグラフィーに供し、各糖鎖アスパラギン誘導体を得ればよい。たとえば、分離はHPLC (ODSカラム、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル=82:15) で行うのが好ましい。

N-アセチルグルコサミン残基の除去による化合物3と7の化合物4と8への変換（第8図）は、化合物3と7を緩衝液（たとえば、リン酸緩衝溶液、酢酸緩衝溶液、グッド緩衝溶液など）に溶かし、公知の条件に従ってN-アセチルグルコサミン加水分解酵素を用いてN-アセチルグルコサミン残基の切断反応を行うことにより成し得る。また、N-アセチルヘキソサミニダーゼ加水分解酵素を用いてもよい。なお、化合物3と7は、それらの混合物であっても、各々単離されたものであってもよい。この反応で用いる各酵素は市販されているエキソ型の酵素を利用するのが好ましい。また、同様の活性を有するものであれば、新たに単離された酵素、遺伝子工学的に創製された酵素であってもよい。次いで、前記と同様にして、反応後に得られる反応液（糖残基が切断された糖鎖アスパラギン誘導体の混合物）をクロマトグラフィーに供し、各糖鎖アスパラギン誘導体を得ればよい。たとえば、分離はHPLC (ODSカラム、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液：メタノール=65:35または50mM酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル=82:15) で行うのが好ましい。

マンノース残基の除去による化合物4と8の化合物5と9への変換（第8図）は、化合物4と8を緩衝液（たとえば、リン酸緩衝溶液、酢酸緩衝溶液、グッド緩衝溶液など）に溶かし、公知の条件に従ってマンノース加水分解酵素を用いてマンノース残基の切断反応を行うことにより成し得る。なお、化合物4と8は、それらの混合物であっても、各々単離されたものであってもよい。この反応で用いるマンノース加水分解酵素は市販されているエキソ型の酵素を利用するのが好ましい。また、同様の活性を有するものであれば、新たに単離された酵素、遺伝子工学的に創製された酵素であってもよい。次いで、前記と同様にして、反応後に得られる反応液（糖残基が切断された糖鎖アスパラギン誘導体の混合物）をクロマトグラフィーに供し、各糖鎖アスパラギン誘導体を得ればよい。たとえば、分離はHPLC (ODSカラム、展開溶媒は、10-200mM程度の酢酸アンモニウムなどの緩衝溶液とアセトニトリル、あるいはエタノール、あるいはメタノール、あるいはブタノール、あるいはプロパノールなどの脂溶性のある水溶性有機溶剤を適宜混ぜて用いることができる。ここに例示する場合、展開溶媒としては50mM酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル=82：18が好適である)で行うのが好ましい。

ガラクト-ス残基の除去による化合物10の化合物11への変換（第9図）は、化合物10を緩衝液（たとえば、リン酸緩衝溶液、酢酸緩衝溶液、グッド緩衝溶液など）に溶かし、前記同様、公知の条件に従ってガラクトース加水分解酵素を用いてガラクトース残基の切断反応を行うことにより成し得る。反応後の反応液（糖残基が切断された糖鎖アスパラギン誘導体の混合物）からの糖鎖アスパラギン誘導体の分離は、たとえば、HPLC (ODSカラム、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル=85：15)で行うのが好ましい。

また、化合物11をさらに任意の糖加水分解酵素を用いて加水分解することで種々の糖鎖アスパラギン誘導体（たとえば、化合物11、12、および13等）へ変換することができる。

N-アセチルグルコサミン残基の除去による化合物11の化合物12への変換

(第9図)は、化合物11を緩衝液(たとえば、リン酸緩衝溶液、酢酸緩衝溶液、グッド緩衝溶液など)に溶かし、前記同様、公知の条件に従ってN-アセチルグルコサミン加水分解酵素等を用いてN-アセチルグルコサミン残基の切断反応を行うことにより成し得る。反応後の反応液(糖残基が切断された糖鎖アスパラギン誘導体の混合物)からの糖鎖アスパラギン誘導体の分離は、たとえば、HPLC(ODSカラム、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液:アセトニトリル=85:18)で行うのが好ましい。

マンノース残基の除去による化合物12の化合物13への変換(第9図)は、化合物12を緩衝液(たとえば、リン酸緩衝溶液、酢酸緩衝溶液、グッド緩衝溶液など)に溶かし、前記同様、公知の条件に従ってマンノース加水分解酵素を用いてマンノース残基の切断反応を行うことにより成し得る。反応後の反応液(糖残基が切断された糖鎖アスパラギン誘導体の混合物)からの各糖鎖アスパラギン誘導体の分離は、たとえば、高速液体カラムクロマトグラフィー(ODSカラム、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液:アセトニトリル=82:18)で行うのが好ましい。

化合物3と7の化合物14と19への変換(第10図)は、化合物3と7を緩衝液(たとえば、リン酸緩衝溶液、酢酸緩衝溶液、グッド緩衝溶液など)に溶かし、公知の条件に従ってシアル酸加水分解酵素を用いてシアル酸残基の切断反応を行うことにより成し得る。なお、化合物3と7は、それらの混合物であっても、各々単離されたものであってもよい。この反応で用いるシアル酸加水分解酵素は市販されているエキソ型の酵素を利用するのが好ましい。また、同様の活性を有するものであれば、新たに単離された酵素、遺伝子工学的に創製された酵素であってもよい。次いで、前記と同様にして、反応後に得られる反応液(糖残基が切断された糖鎖アスパラギン誘導体の混合物)をクロマトグラフィーに供し、各糖鎖アスパラギン誘導体を得ればよい。たとえば、分離は高速液体カラムクロマト

グラフィー(ODSカラム、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液:アセトニトリル=85:15)で行うのが好ましい。

N-アセチルグルコサミン残基の除去による化合物14と19の化合物15と20への変換(第10図)は、化合物14と19を緩衝液(たとえば、リン酸緩衝溶液、酢酸緩衝溶液、グッド緩衝溶液など)に溶かし、前記同様、公知の条件に従ってN-アセチルグルコサミン加水分解酵素等を用いてN-アセチルグルコサミン残基の切断反応を行うことにより成し得る。反応後の反応液(糖残基が切断された糖鎖アスパラギン誘導体の混合物)からの各糖鎖アスパラギン誘導体の分離は、たとえば、高速液体カラムクロマトグラフィー(ODSカラム、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液:アセトニトリル=82:18)で行うのが好ましい。

マンノース残基の除去による化合物15と20の化合物16と21への変換(第10図)は、化合物15と20を緩衝液(たとえば、リン酸緩衝溶液、酢酸緩衝溶液、グッド緩衝溶液など)に溶かし、前記同様、公知の条件に従ってマンノース加水分解酵素を用いてマンノース残基の切断反応を行うことにより成し得る。反応後の反応液(糖残基が切断された糖鎖アスパラギン誘導体の混合物)からの各糖鎖アスパラギン誘導体の分離は、たとえば、高速液体カラムクロマトグラフィー(ODSカラム、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液:アセトニトリル=82:18)で行うのが好ましい。

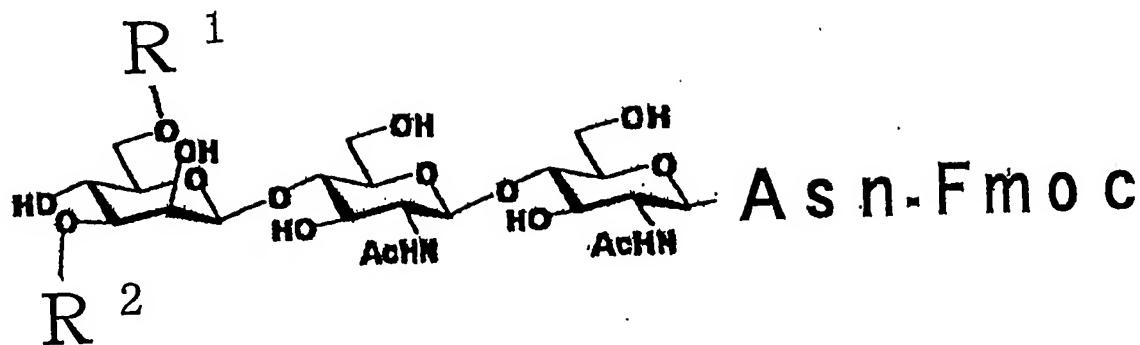
ガラクトース残基の除去による化合物16と21の化合物17と22への変換(第11図)は、化合物16と21を緩衝液(たとえば、リン酸緩衝溶液、酢酸緩衝溶液、グッド緩衝溶液など)に溶かし、前記同様、公知の条件に従ってガラクトース加水分解酵素を用いてガラクトース残基の切断反応を行うことにより成し得る。反応後の反応液(糖残基が切断された糖鎖アスパラギン誘導体の混合物)からの各糖鎖アスパラギン誘導体の分離は、たとえば、高速液体カラムクロマトグラフィー(ODSカラム、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液:アセトニトリル=85:15)で行うのが好ましい。

N-アセチルグルコサミン残基の除去による化合物17と22の化合物1.8と23への変換（第11図）は、化合物17と22を緩衝液（たとえば、リン酸緩衝溶液、酢酸緩衝溶液、グッド緩衝溶液など）に溶かし、前記同様、公知の条件に従ってN-アセチルグルコサミン加水分解酵素等を用いてN-アセチルグルコサミン残基の切断反応を行うことにより成し得る。反応後の反応液（糖残基が切断された糖鎖アスパラギン誘導体の混合物）からの各糖鎖アスパラギン誘導体の分離は、たとえば、高速液体カラムクロマトグラフィー（ODSカラム、展開溶媒は50 mM酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル=82:18）で行うのが好ましい。

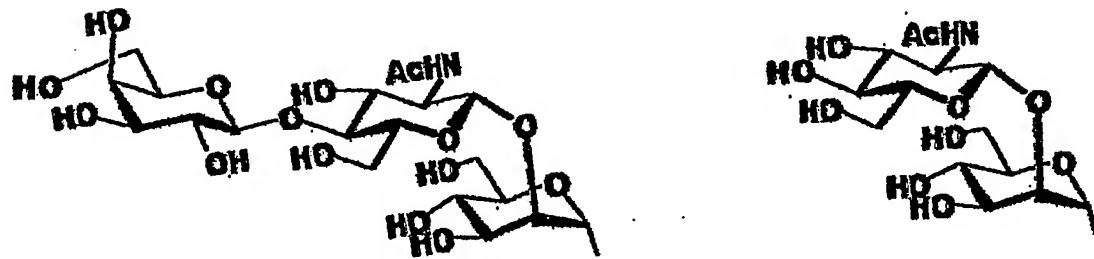
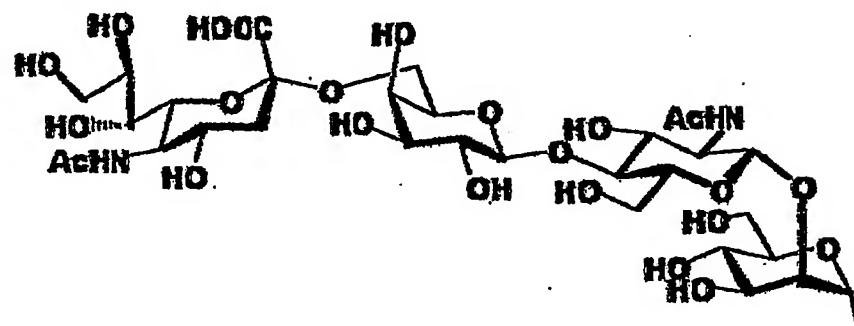
このように、各糖鎖アスパラギン誘導体を得た後、さらに各種糖加水分解酵素等を用いて当該誘導体を加水分解し、糖鎖の非還元末端の糖残基を除去することにより、たとえば、糖鎖の末端の分岐構造が不均一な様々な糖鎖アスパラギン誘導体をそれぞれ単一化合物として得ることができる。また、種々の糖加水分解酵素を用い、加水分解する順番やその種類を変えることで、より多くの種類の糖鎖アスパラギン誘導体を製造することができる。

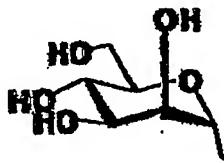
従来の方法によれば、極限られた糖鎖構造を有する糖鎖アスパラギン誘導体を分析スケールで得るのにさえ膨大な時間とコストが必要であったが、本発明によれば、特別の装置や試薬を必要とすることなく、慣用のゲルろ過カラム、HPLCカラムや、少なくとも3種類の糖加水分解酵素（たとえば、ガラクトース加水分解酵素、マンノース加水分解酵素、N-アセチルグルコサミン加水分解酵素）等を使って、2週間程度で所望の糖鎖構造を有する糖鎖アスパラギン誘導体を1グラム程度調製することが可能である。

以上の操作により、たとえば、保護基がFmoc基である場合、一般式：

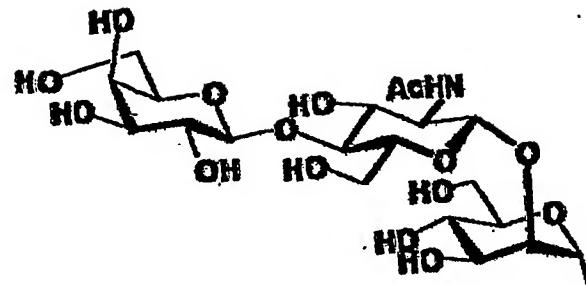


(式中、R¹ および R² は、H、



または  であり、同一でも異なっていてもよい。ただし、

R¹ および R² が共に

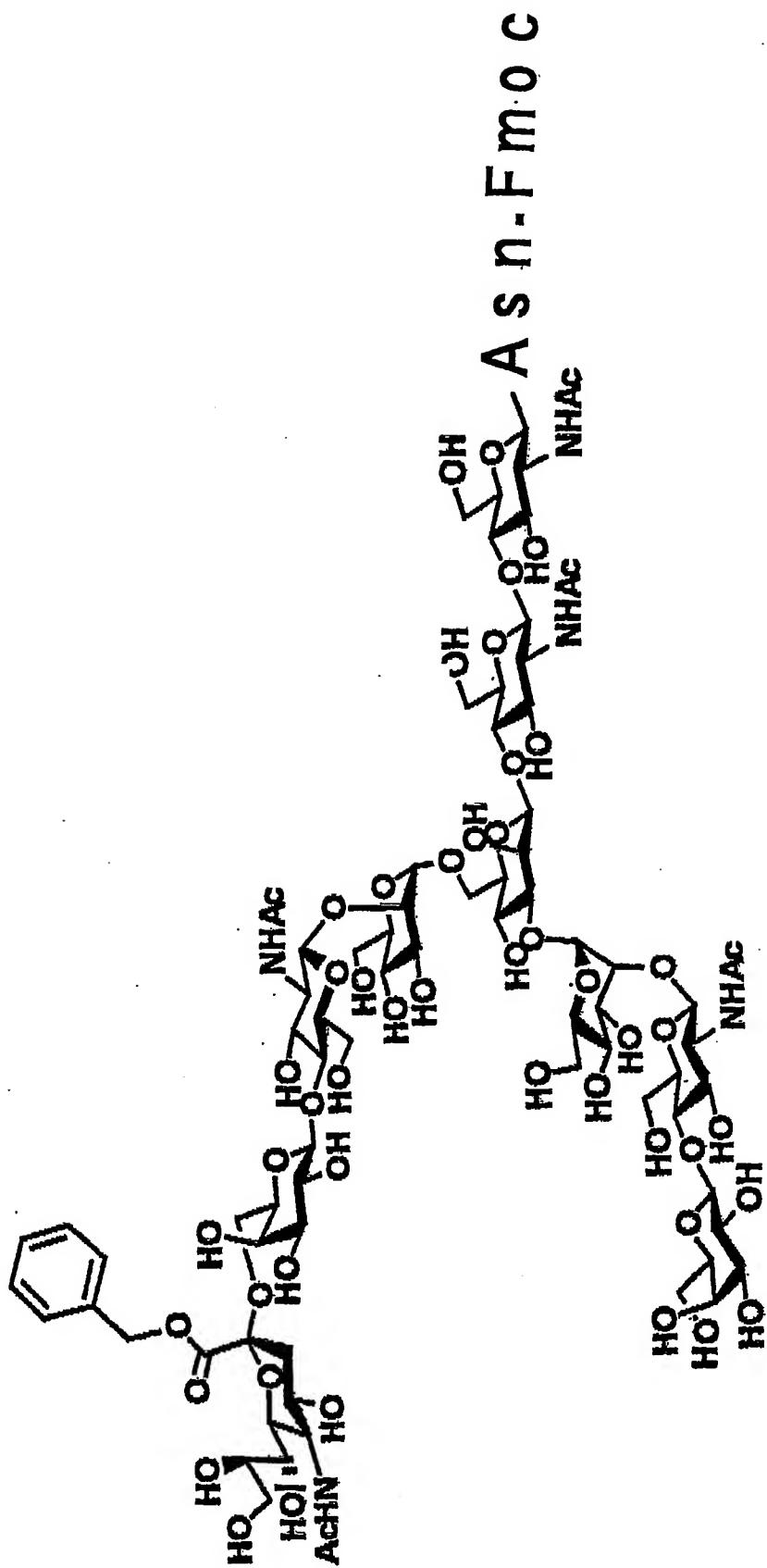


である場合を除く。)

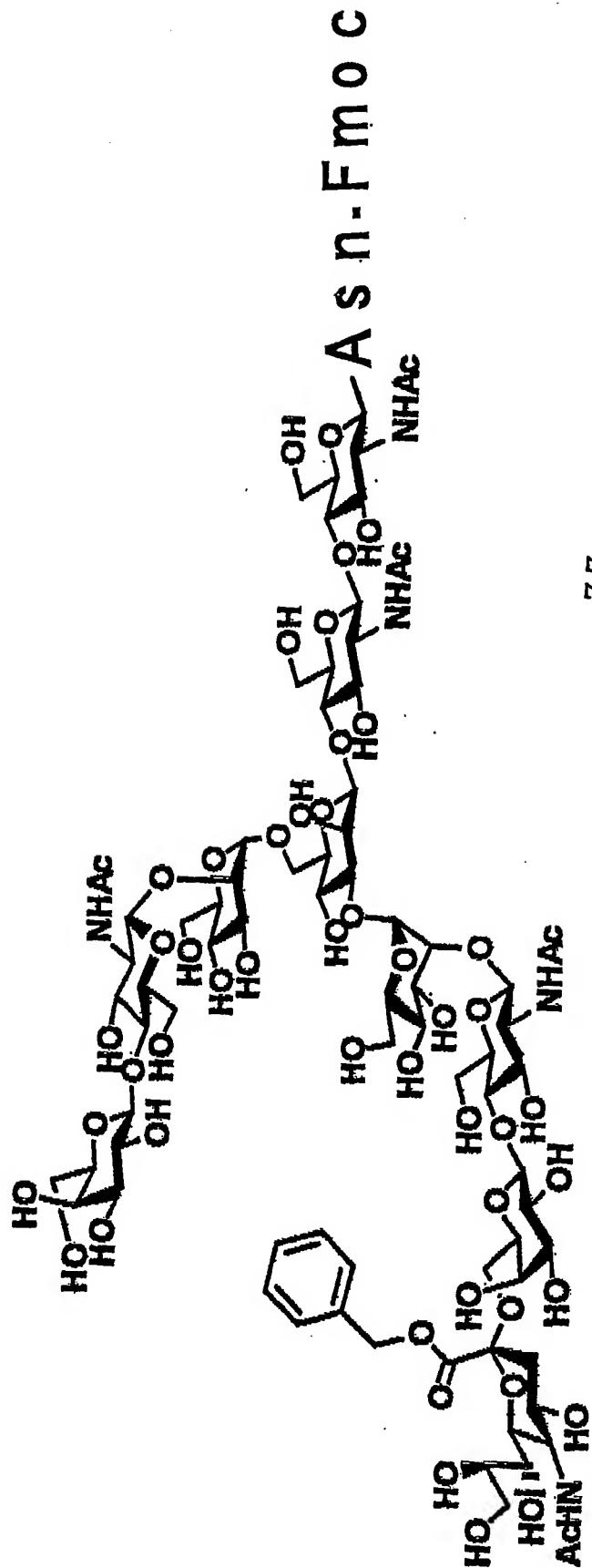
を有する糖鎖アスパラギン誘導体を効率的に得ることができる。かかる糖鎖アスパラギン誘導体としては、具体的には、たとえば、第1図および第2図に示す各化合物をあげることができる。中でも、化合物1、化合物2～9、11～23、70および71は本発明において初めて製造された化合物である。本発明は当該化合物を包含する。

また、本発明の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法の好ましい態様として、工程(a)が、非還元末端にシアル酸残基を有する1種もしくは2種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物を用い、該混合物に含まれる糖鎖アスパラギンにFmo_c基を導入し、かつシアル酸残基にベンジル基を導入して糖鎖アスパラギン誘導体混合物を得る工程である、糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法を提供する。かかる製造方法によればさらに効率的に種々の型の糖鎖アスパラギン誘導体を大量に得ることができる。たとえば、第1図に示す化合物2と6の分離効率を向上させ、両化合物の製造を効率的に行うことができる。すなわち、化合物2と6の混

合物から直接的に両化合物を明確に分離することは効率的に不利であるが、本態
様では、両化合物のシアル酸残基にベンジル基を導入し、一旦、以下の化合物 7
6 と 7 7 :



25 / 1



の混合物として前記工程 (b) に供することになり、化合物 76 と 77 の分離は比較的容易に行うことができることから両化合物を分離でき、次いでベンジル基を後述する方法により脱離させれば化合物 2 と 6 の混合物から両化合物を効率的に分離して得ることができる。

化合物 2 と 6 の分離がやや困難である一方、それらのシアル酸残基にベンジル基を導入して得られる化合物 76 と 77 の分離が容易に行えるのは、シアル酸残基のカルボキシル基に脂溶性の高いベンジル基を導入し、HPLC (高速液体クロマ

トグラフィー) の逆相カラムとの疎水性相互作用をさらに高めたことによると考えられる。従って、分離工程 (b) において好適に使用される逆相系カラムとの相互作用が格段に向上し、その結果、より鋭敏に糖鎖構造の差を反映して両化合物が分離されるようになったと推定される。

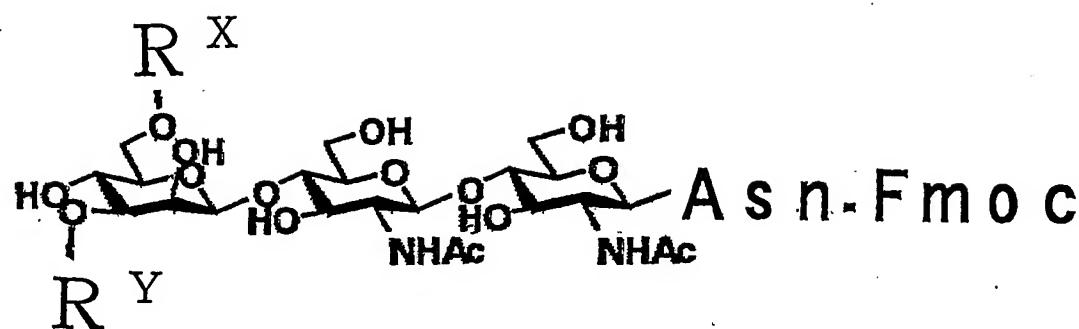
非還元末端にシアル酸残基を有する 1 種もしくは 2 種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物としては、かかる構造を有する糖鎖アスパラギンを 1 種もしくは 2 種以上含む混合物であれば特に限定されるものではない。入手容易性の観点から、非還元末端にシアル酸残基を有し、還元末端にアスパラギンが結合した糖鎖を 1 種もしくは 2 種以上含む混合物が好適である。当該混合物としては、前記した、第 3 図に示す化合物 24 および／または該化合物において 1 以上の糖残基が欠失した化合物を含む混合物が好適である。

また、所望の糖鎖構造を有する糖鎖アスパラギン誘導体をさらに効率的に得る観点から、前記工程 (b') を実施するのが好適である。

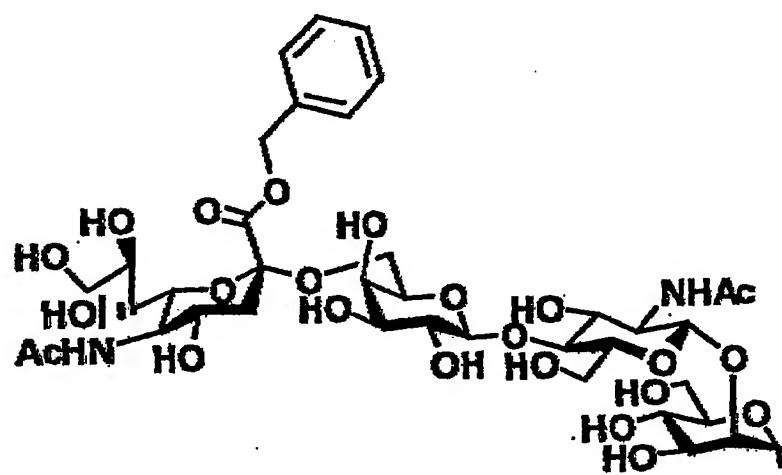
なお、本態様においては糖鎖アスパラギン誘導体はベンジル基と Fmoc 基が導入されたもの、および Fmoc 基のみが導入されたものがそれぞれ得られることになる。

糖鎖アスパラギンのシアル酸残基へのベンジル基の導入は公知の方法 (たとえば、Protecting groups in Organic chemistry, John Wiley & Sons INC., New York 1991, ISBN 0-471-62301-6 を参照) に従えばよい。

以上の操作により、たとえば、一般式：

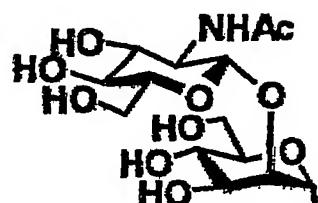
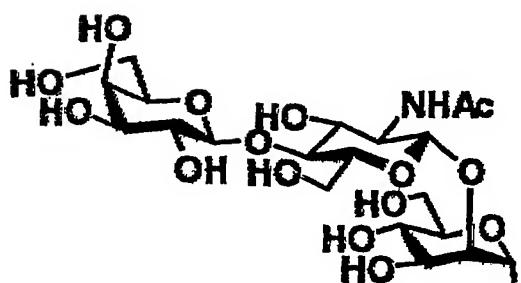
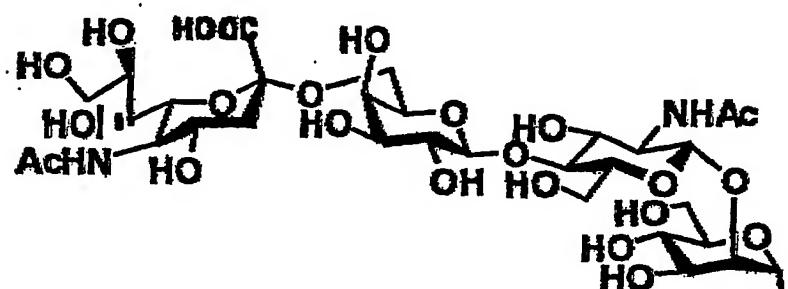
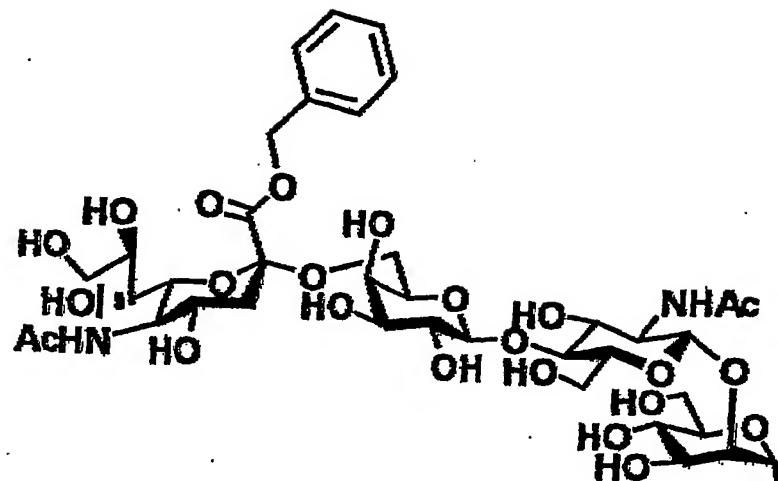


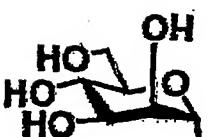
(式中、 R^X および R^Y は、一方が



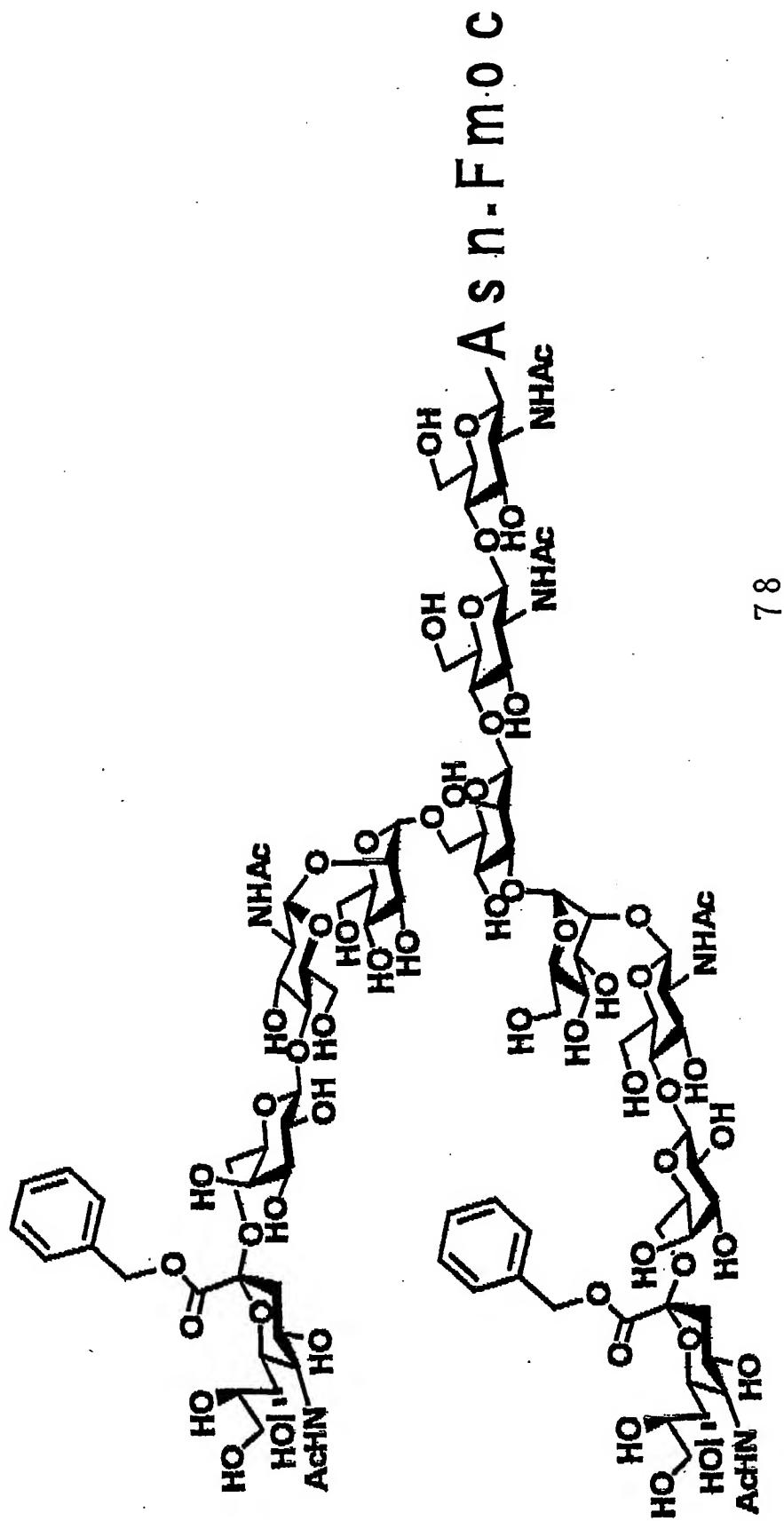
であり、

他方が、H、



または  である。)

を有する、ベンジル基とFmoc基が導入された糖鎖アスパラギン誘導体を効率的に得ることができる。かかる糖鎖アスパラギン誘導体としては、具体的に前記化合物76および77や、以下の化合物78：



が挙げられる。本態様により得られた糖鎖アスパラギン誘導体は糖ペプチドの固相合成に直接使用することができる。該糖鎖アスパラギン誘導体のシアル酸残基に存在するカルボキシル基はベンジル基により保護されていることから、ベンジル基を導入していない糖鎖アスパラギン誘導体と比べ、糖ペプチドの固相合成においては該カルボキシル基が関与する副反応が生ずることなく効率的に所望の糖ペプチドを得ることができる、という利点を有する。

また本発明は、種々の単離された糖鎖アスパラギンを大量に得ることができる糖鎖アスパラギンの製造方法を提供する。当該方法は、前記糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法に従う糖鎖アスパラギン誘導体の製造工程に続き、さらに、得られた糖鎖アスパラギン誘導体から保護基を除去する工程を含むものである。

すなわち、本発明の糖鎖アスパラギンの製造方法は、

(a) 1種もしくは2種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物に含まれる該糖鎖アスパラギンに脂溶性の保護基を導入して糖鎖アスパラギン誘導体混合物を得る工程、

(b) 該糖鎖アスパラギン誘導体混合物または該糖鎖アスパラギン誘導体混合物に含まれる糖鎖アスパラギン誘導体を加水分解して得られる混合物をクロマトグラフィーに供して各糖鎖アスパラギン誘導体を分離する工程、ならびに

(c) 工程 (b) で分離された糖鎖アスパラギン誘導体の保護基を除去して糖鎖アスパラギンを得る工程、

を含むものである。

工程 (a) および (b) は、前記糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法の場合と同様であり、使用される1種もしくは2種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物および脂溶性の保護基も前記と同様である。

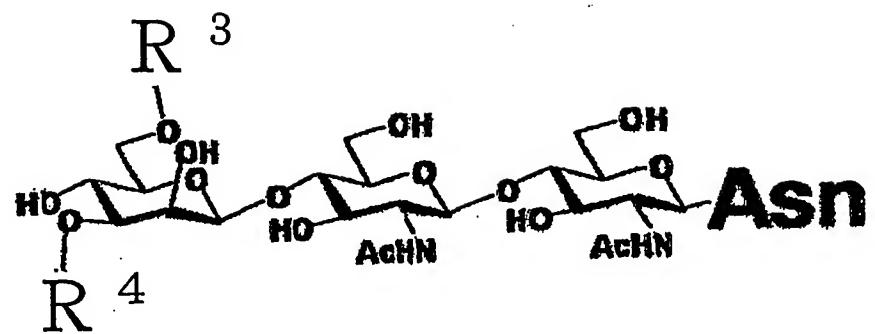
工程 (c) における糖鎖アスパラギン誘導体からの保護基の除去は、公知の方法に従って行うことができる(たとえば、Protecting groups in Organic chemistry, John Wiley & Sons INC., New York 1991, ISBN 0-471-62301-6を参照)

。たとえば、保護基がFmoc基である場合、第12図に模式的に示すように、N,N-ジメチルホルムアミド(DMF)中、糖鎖アスパラギン誘導体にモルフォリンを加えて反応を行うことによりFmoc基を除去することができる。また、Boc基は弱酸を反応させることで除去することができる。保護基除去後、所望により適宜、公知の方法、たとえば、ゲル濾過カラム、イオン交換カラムなどを使用する各種クロマトグラフィーや、HPLCによる分離という方法によって精製することにより、糖鎖アスパラギンを得てもよい。

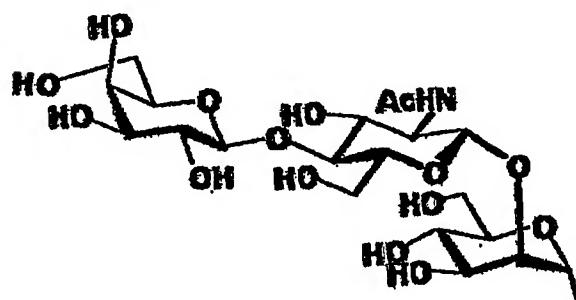
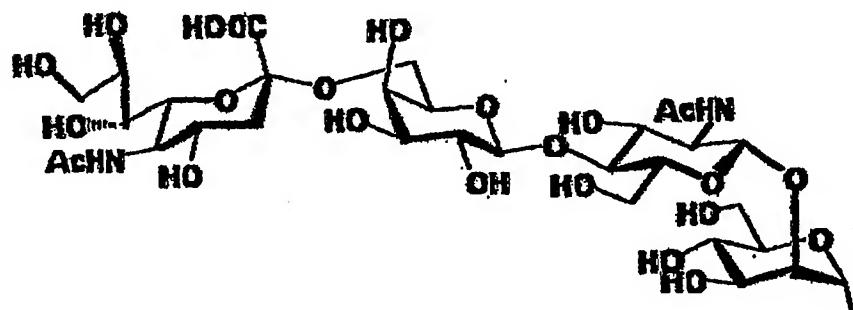
また、前記糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法と同様、本発明の糖鎖アスパラギンの製造方法の好ましい態様として、工程(a)が、非還元末端にシアル酸残基を有する1種もしくは2種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物を用い、該混合物に含まれる糖鎖アスパラギンにFmoc基を導入し、かつシアル酸残基にベンジル基を導入して糖鎖アスパラギン誘導体混合物を得る工程である、糖鎖アスパラギンの製造方法を提供する。かかる態様においては工程(c)において、Fmoc基の除去に加えて、ベンジル基の除去を行う。ベンジル基の除去は、公知の方法に従って行うことができる(たとえば、Protecting groups in Organic chemistry, John Wiley & Sons INC., New York 1991, ISBN 0-471-62301-6を参照)。

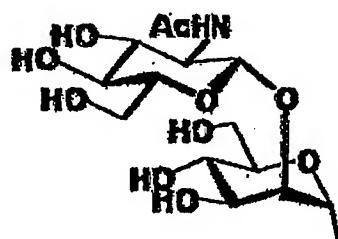
さらに、前記同様、所望の糖鎖構造を有する糖鎖アスパラギンを効率的に得る観点から、工程(b)で分離された糖鎖アスパラギン誘導体を加水分解する、および/または工程(c)で得られた糖鎖アスパラギンを加水分解するのが好適である。なお、加水分解は前記同様にして行うことができる。所望の糖鎖構造を有する糖鎖アスパラギンをより効率的に得る観点から、糖加水分解酵素を用いて加水分解する[工程(b')および/または工程(c')]のがより好ましい。

以上の操作により、たとえば、
一般式：

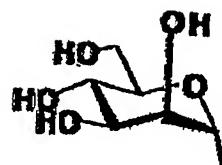


(式中、R³ およびR⁴ は、H、



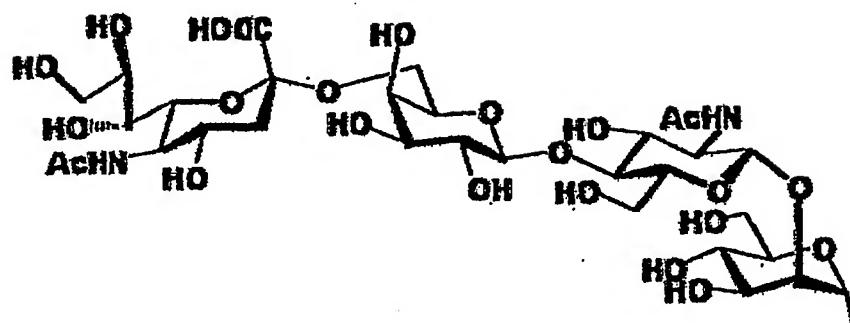


または

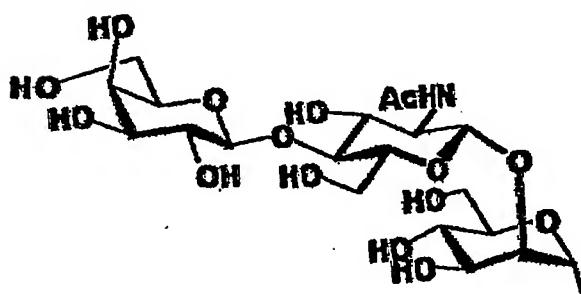


であり、

同一でも異なっていてもよい。ただし、R³ および R⁴ が共に



または



である場合を除く。)

を有する糖鎖アスパラギンを効率的に得ることができる。かかる糖鎖アスパラギンとしては、具体的には、たとえば、第3図および第4図に示す各化合物をあげることができる。中でも、化合物25～32、34～46、72および73は本発明において初めて製造された化合物である。本発明は当該化合物を包含する。

さらに本発明は、種々の単離された糖鎖を大量に得ることができる糖鎖の製造方法を提供する。当該方法は、前記糖鎖アスパラギンの製造方法に従う糖鎖アスパラギンの製造工程に続き、さらに、得られた糖鎖アスパラギンからアスパラギン残基を除去する工程を含むものである。

すなわち、本発明の糖鎖の製造方法は、

(a) 1種もしくは2種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物に含まれる該糖鎖

アスパラギンに脂溶性の保護基を導入して糖鎖アスパラギン誘導体混合物を得る工程、

(b) 該糖鎖アスパラギン誘導体混合物または該糖鎖アスパラギン誘導体混合物に含まれる糖鎖アスパラギン誘導体を加水分解して得られる混合物をクロマトグラフィーに供して各糖鎖アスパラギン誘導体を分離する工程、

(c) 工程 (b) で分離された糖鎖アスパラギン誘導体の保護基を除去して糖鎖アスパラギンを得る工程、ならびに

(d) 工程 (c) で得られた糖鎖アスパラギンのアスパラギン残基を除去して糖鎖を得る工程、

を含むものである。

工程 (a) ~ (c) は、前記糖鎖アスパラギンの製造方法の場合と同様であり、使用される1種もしくは2種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物および脂溶性の保護基も前記と同様である。

また、本発明の糖鎖の製造方法においても、その好ましい態様として、工程 (a) が、非還元末端にシアル酸残基を有する1種もしくは2種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物を用い、該混合物に含まれる糖鎖アスパラギンにFmoc基を導入し、かつシアル酸残基にベンジル基を導入して糖鎖アスパラギン誘導体混合物を得る工程である、糖鎖アスパラギンの製造方法を提供する。かかる態様においては工程 (c) において、Fmoc基の除去に加えて、ベンジル基の除去を行う。ベンジル基の除去は、前記方法に従って行うことができる。

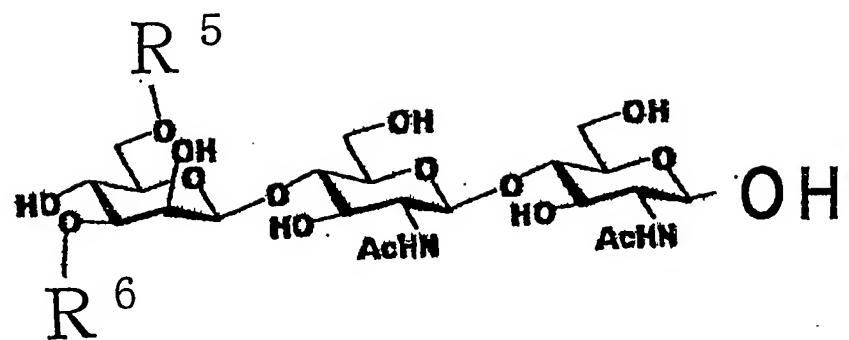
工程 (d) における糖鎖アスパラギンからのアスパラギン残基の除去は、公知の方法に従って行うことができる。たとえば、第12図に模式的に示すように、糖鎖アスパラギンを無水ヒドラジンと反応させた後、アセチル化することによりアスパラギン残基を除去して糖鎖を得ることができる。また、糖鎖アスパラギンを塩基性水溶液で加熱還流後、アセチル化することによってもアスパラギン残基を除去して糖鎖を得ることができる。アスパラギン残基除去後、所望により適宜、公

知の方法、たとえば、ゲル濾過カラム、イオン交換カラムなどを使用する各種クロマトグラフィーや、HPLCによる分離という方法によって精製してもよい。

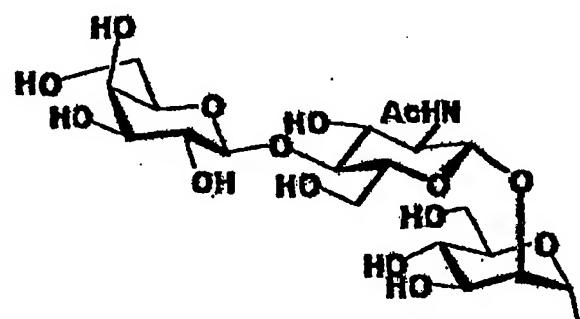
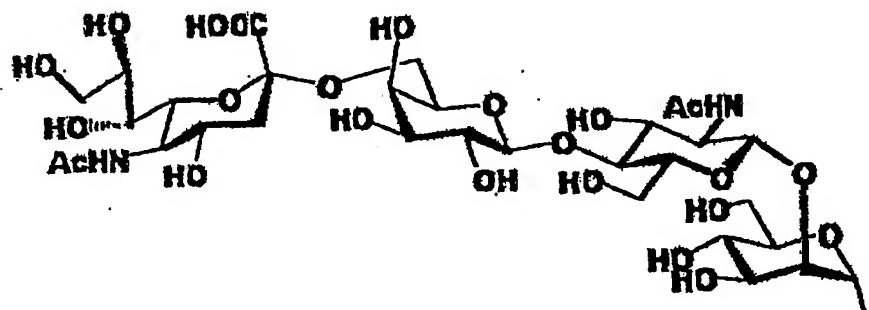
さらに、前記同様、所望の糖鎖構造を有する糖鎖を効率的に得る観点から、工程（b）で分離された糖鎖アスパラギン誘導体を加水分解する、および／または工程（c）で得られた糖鎖アスパラギンを加水分解する、および／または工程（d）で得られた糖鎖を加水分解するのが好適である。なお、加水分解は前記同様にして行うことができる。所望の糖鎖構造を有する糖鎖をより効率的に得る観点から、糖加水分解酵素を用いて加水分解する〔工程（b'）および／または工程（c'）および／または工程（d'）〕のがより好ましい。

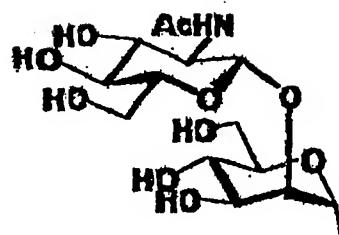
以上の操作により、たとえば、

一般式：

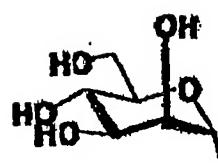


(式中、R⁵ および R⁶ は、H、



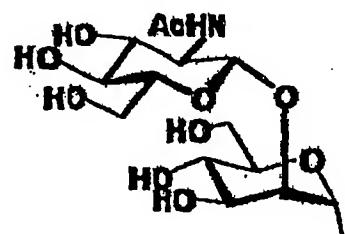
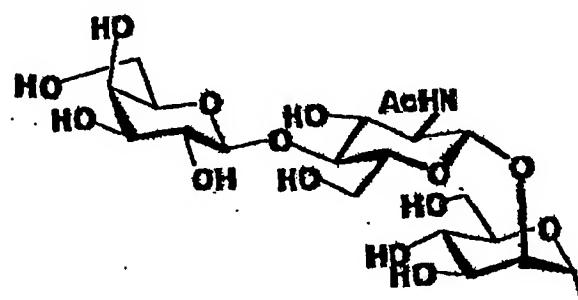
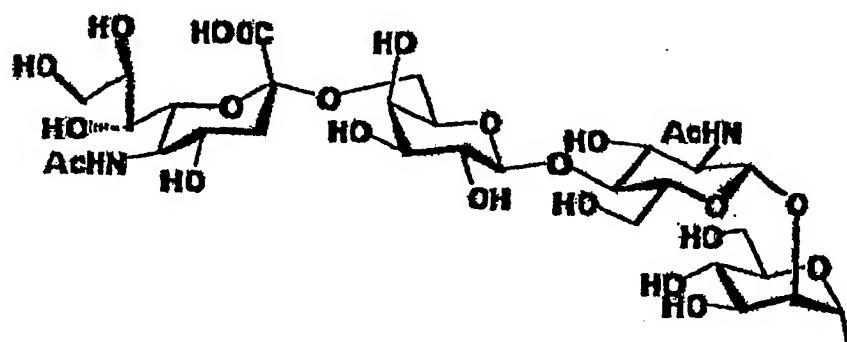


、または

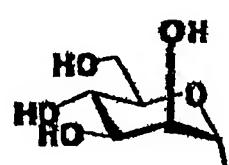


であり、

同一でも異なっていてもよい。ただし、R⁵ および R⁶ が共に



または  であるか、あるいはR⁵またはR⁶の一方がHであり、

かつ他方が  である場合を除く。)

を有する糖鎖を効率的に得ることができる。かかる糖鎖としては、具体的には、たとえば、第5図および第6図に示す各化合物をあげることができる。中でも、化合物48～55、57～69、74および75は本発明において初めて製造された化合物である。本発明は当該化合物を包含する。

このように、本発明によれば、所望の糖鎖構造を有する糖鎖アスパラギン誘導体、糖鎖アスパラギンおよび糖鎖（以下、3つ併せて糖鎖類という場合がある）

を安価かつ効率的に大量に製造することができる。

かかる糖鎖類は医薬品開発等の分野において非常に有用である。たとえば、医薬品開発における応用例としては、たとえば、ガンのワクチン合成があげられる。細胞がガン化すると体内にはなかった糖鎖が発現することが知られている。また、当該糖鎖を化学的に合成し、ワクチンとして個体に投与すると、ガンの増殖が抑制されることも知られている。そこで、本発明により所望の糖鎖類を製造することができれば、ガンの治療に有効なワクチンの合成を行うことが可能である。また、本発明により得られる糖鎖類を、さらに化学的な反応および糖転移酵素による反応などを組み合わせて新たな糖残基を結合させて誘導体化し、新規なワクチンの合成を行うことも可能である。

また、たとえば、糖タンパク質であるエリスロポエチン（EPO）が、その赤血球増殖能により貧血の治療薬として使われているが、このEPOは糖鎖が結合していないと活性がでないことが判明している。このように、タンパク質には糖鎖の結合によって生理活性を発現するものがあるので、たとえば、糖鎖を結合させることができない大腸菌発現系によりタンパク質のみを大量に調製し、次いで所望の糖鎖構造を有する、本発明により製造した糖鎖を導入することにより生理活性の発現を付与したり、また、任意のタンパク質に種々の糖鎖構造を有する、本発明により製造した糖鎖を導入することにより、新たな生理活性を有する新規な糖タンパク質を合成することも可能である。

また、天然の糖タンパク質に存在する糖鎖を本発明により製造した糖鎖と置換することにより新たな生理活性を付与することも可能である。糖タンパク質が有する糖鎖を本発明により得られた糖鎖と置換する技術としては、たとえば、P. Sears and C. H. Wong, Science, 2001, vol291, p2344 ~2350に記載の方法をあげることができる。すなわち、糖タンパク質を β -N- アセチルグルコサミニダーゼ (Endo-H) で処理してタンパク質表面のアスパラギン残基にはN-アセチルグルコサミン残基が1つだけ結合した状態にする。次いで、本発明により得られた糖鎖

アスパラギン（たとえば、第3図および第4図の各化合物）中の所望の糖鎖を β -N-アセチルグルコサミニダーゼ（Endo-M）を用いて、前記N-アセチルグルコサミン残基に結合させるという方法があげられる。また、tRNAにN-アセチルグルコサミンを結合させておいて、大腸菌などの発現系を利用してN-アセチルグルコサミン残基を有する糖タンパク質を合成後、本発明により得られた糖鎖アスパラギン中の所望の糖鎖をEndo-Mを用いて導入することも可能である。

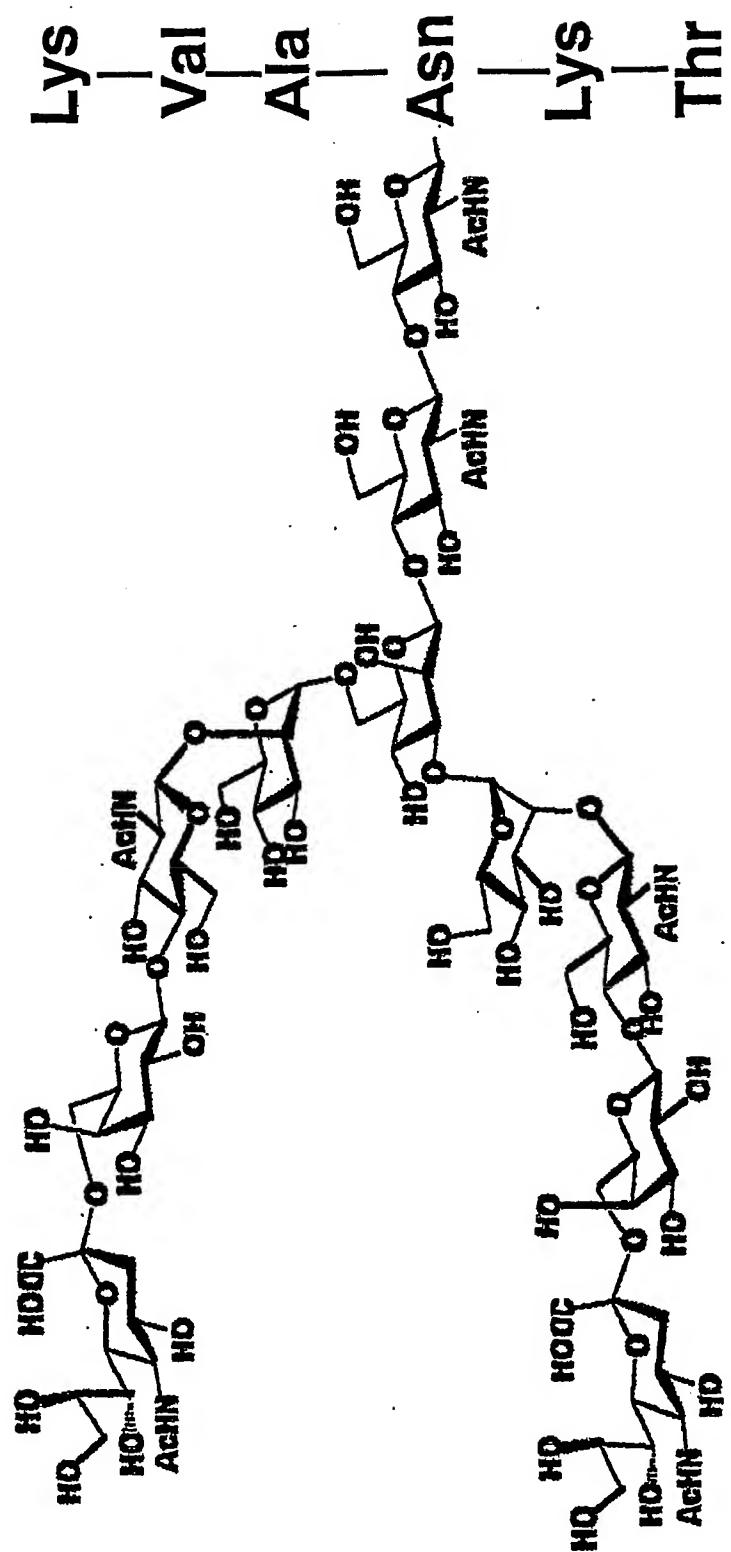
また、現在、糖タンパク質を治療薬として利用する際の問題として、投与された糖タンパク質の代謝速度が速いことがあげられる。これは、糖タンパク質の糖鎖末端に存在するシアル酸が生体内で除去されると直ちに当該糖タンパク質が肝臓により代謝されることによる。そのため、ある程度の量の糖タンパク質を投与する必要がある。そこで、本発明により糖鎖の末端に除去されにくいシアル酸を新たに組み込んだ糖鎖を製造し、対象タンパク質に当該糖鎖をEndo-Mを利用して導入すれば、生体内での糖タンパク質の代謝速度を制御することが可能となり、投与する糖タンパク質の量を低くすることも可能である。

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明はかかる実施例に限定されるものではない。各化合物の構造式および番号を第1図～第6図に示す。なお、¹H-NMRのデータは、実施例1～7については30°CでHODを4.8ppmとして、実施例8～45については30°Cで内部標準としてアセトンのメチル基のシグナルを2.225ppm、HODを4.718ppmとして測定して得られた値である。また、Fmoc基が除去された化合物については測定溶媒中に50mMの炭酸水素アンモニウムを共存させて測定した。

実施例1 化合物24の合成

卵由来粗精製SGP（シアリルグリコペプチド）2.6gをトリス-塩酸・塩化カルシウム緩衝溶液（TRIZMA BASE 0.05mol/l、塩化カルシウム0.01mol/l、pH7.

5) 100ml に溶解させた。これにアジ化ナトリウム58mg (772 μmol)とアクチナーゼ-E (科研製薬社製) 526mg を加え、37°Cで静置した。65時間後、再びアクチナーゼ-Eを263mg 加え、更に37°Cで24時間静置した。この溶液を凍結乾燥した後、残留物をゲルfiltrationカラムクロマトグラフィー (Sephadex G-25、2.5 $\phi \times 1\text{m}$ 、展開溶媒は水、流速は1.0ml/min.) で2回精製し、目的の第3図に示す化合物24を1.3g (555 μmol) 得た。SGPに含まれる糖鎖の構造を以下に示す。



また、得られた化合物24の物理的データは以下の通りである。

¹H-NMR (D₂O, 30°C)

5.15 (1H, s, Man4- H₁), 5.06 (1H, d, GlcNAc1- H₁), 4.95 (1H, s, Man4'- H₁), 4.82 (1H, s, Man3- H₁), 4.69 (1H, d, GlcNAc2- H₁), 4.67 (2H, d, GlcNAc5, 5'- H₁), 4.53 (2H, d, Gal6, 6'- H₁), 4.34 (1H, d, Man3- H₂), 4.27 (1H, d, Man4'- H₂), 4.19 (1H, d, Man4- H₂), 3.03 (1H, dd, Asn- β CH), 3.00 (1H, dd, Asn- β CH), 2.76 (2H, dd, NeuAc7, 7'- H_{3eq}), 2.15 (18H, s \times 6, -Ac), 1.79 (2H, dd, NeuAc7, 7'- H_{3ax})

実施例2 化合物1、2、6および10の合成

実施例1で得られた化合物24 (609mg, 261 μ mol) を水20.7mlに溶解させ、さらに0.1規定塩酸13.8mlを加えた。この溶液を70°Cで35分間加熱した後速やかに氷冷し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えpH7とした。これを凍結乾燥した後、残留物をゲルfiltrationカラムクロマトグラフィー (Sephadex G-25, 2.5 ϕ \times 1

Ⅲ、展開溶媒は水、流速は1.0ml/min.)で精製したところ、第3図に示す化合物24、化合物25および29、化合物33の混合物534mgを得た。この4成分はそれを単離することなく次の工程に進めた。

なお、得られた糖鎖混合物の物理的データは以下の通りである。

¹H-NMR (D₂O, 30°C)

5.13 (s, Man4-H₁), 5.12 (s, Man4-H₁), 5.01 (d, GlcNAc1-H₁), 4.94 (s, Man4'-H₁), 4.93 (s, Man4'-H₁), 4.82 (s, Man3-H₁), 4.60 (d, GlcNAc2-H₁), 4.58 (d, GlcNAc5, 5'-H₁), 4.47 (dd, Gal6, 6'-H₁), 4.44 (d, Gal6, 6'-H₁), 4.24 (d, Man3-H₂), 4.19 (d, Man4'-H₂), 4.11 (d, Man4-H₂), 2.97 (bdd, Asn- β CH), 2.72 (dd, NeuAc7-H_{3eq}, NeuAc7-H_{3eq}), 2.64 (bdd, Asn- β CH), 2.15 (s \times 5, -Ac), 1.79 (dd, NeuAc7-H_{3ax}, NeuAc7'-H_{3ax})

得られた糖鎖の混合物429mgをアセトン16.3mlと水11.2mlに溶解させた。ここに9-フルオレニルメチル-N-スクシニミジルカーポネート(155.7mg, 461.7 μ mol)と炭酸水素ナトリウム(80.4mg, 957 μ mol)を加え、室温で2時間攪拌した。この溶液をエバポレーターに供してアセトンを除き、残りの溶液をゲルfiltrationカラムクロマトグラフィー(Sephadex G-25, 2.5 ϕ \times 1m、展開溶媒は水、流速は1.0ml/min.)で精製したところ、第1図に示す化合物1、化合物2および6、化合物10の混合物309mgが得られた。この混合物をHPLC(ODSカラム、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液:メタノール=65:35, 2.0 ϕ \times 25cm、流速3ml/min.)を用いて精製したところ、51分後に化合物1が、67分後に化合物2および6の混合物が、93分後に化合物10が溶出した。それぞれを取り分け凍結乾燥を行った後、ゲルfiltrationカラムクロマトグラフィー(Sephadex G-25, 2.5 ϕ \times 30cm、展開溶媒は水、流速は1.0ml/min.)で脱塩することで目的の化合物2および6の混合物150mgを得た。

なお、得られた化合物1の物理的データは以下の通りである。

¹H-NMR (D₂O, 30°C)

7.99 (2H, d, Fmoc), 7.79 (2H, d, Fmoc), 7.55 (4H, m, Fmoc), 5.15 (1H, s, Man4- H₁), 5.06 (1H, d, GlcNAc1- H₁), 4.95 (1H, s, Man4'-H₁), 4.82 (1H, s, Man3- H₁), 4.69 (1H, d, GlcNAc2- H₁), 4.67 (2H, d, GlcNAc5, 5'- H₁), 4.53 (2H, d, Gal6, 6'- H₁), 4.34 (1H, d, Man3- H₂), 4.27 (1H, d, Man4'- H₂), 4.19 (1H, d, Man4- H₂), 3.03 (1H, bdd, Asn- β CH), 3.00 (1H, bdd, Asn- β CH), 2.76 (2H, dd, NeuAc7, 7'- H_{3eq}), 2.15 (18H, s \times 6, -Ac), 1.79 (2H, dd, NeuAc7, 7'- H_{3ax}) ; HRMS Calcd for C₁₀₃H₁₅₄N₈NaO₆₆[M+Na⁺] 2581.8838, found 2581.8821.

また、得られた化合物2および6の混合物の物理的データは以下の通りである。

¹H-NMR (D₂O, 30°C)

7.99 (d, Fmoc), 7.79 (d, Fmoc), 7.55 (m, Fmoc), 5.14 (s, Man4- H₁), 5.12 (s, Man4- H), 5.00 (d, GlcNAc1- H₁), 4.94 (s, Man4'- H₁), 4.93 (s, Man4'- H₁), 4.82 (s, Man3- H₁), 4.60 (d, GlcNAc2- H₁), 4.58 (d, GlcNAc5, 5'- H₁), 4.46 (dd, Gal6, 6' - H₁), 4.44 (d, Gal6, 6' - H₁), 4.24 (d, Man3- H₂), 4.19 (d, Man4'- H₂), 4.11 (d, Man4- H₂), 2.97 (bdd, Asn- β CH), 2.72 (dd, NeuAc7- H_{3eq}, NeuAc7- H_{3eq}), 2.64 (bdd, Asn- β CH), 2.15 (s \times 5, -Ac), 1.79 (dd, NeuAc7- H_{3ax}, NeuAc7'- H_{3ax})

また、得られた化合物10の物理的データは以下の通りである。

¹H-NMR (D₂O, 30°C)

7.99 (2H, d, Fmoc), 7.79 (2H, d, Fmoc), 7.55 (4H, m, Fmoc), 5.12 (1H, s, Man4- H₁), 5.06 (1H, d, GlcNAc1- H₁), 4.93 (1H, s, Man4'- H₁), 4.82 (1H, s, Man3- H₁), 4.69 (1H, d, GlcNAc2- H₁), 4.67 (2H, d, GlcNAc5, 5'- H₁), 4.53 (2H, d, Gal6, 6'- H₁), 4.34 (1H, d, Man3- H₂), 4.27 (1H, d, Man4'- H₂), 4.19 (1H, d, Man4- H₂), 3.03 (1H, bdd, Asn- β CH), 3.00 (1H, bdd, Asn- β CH), 2.15 (12H, s \times 4, -Ac) ; HRMS Calcd for C₈₁H₁₂₀N₆NaO₅₀[M+Na⁺] 19

99.6930, found 1999.6939.

実施例3 化合物3および7の合成

実施例2で得られた化合物2および6の混合物(224mg, 97 μ mol)とウシ血清アルブミン24mgをHEPES緩衝溶液(50mM, pH6.0)22mlに溶解させ、さらにDiplococcus pneumoniae由来 β -ガラクトシダーゼ(1.35U)を加えた。この溶液を37℃で15時間静置した後、凍結乾燥を行った。残留物をHPLC(ODSカラム、2.0 ϕ \times 25cm、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル=85:15、流速3ml/min)で精製したところ、129分後に第2図に示す化合物3が、134分後に化合物7が溶出した。それぞれを取り分け、凍結乾燥を行った。続いてHPLC(ODSカラム、2.0 ϕ \times 25cm、展開溶媒は最初の15分間が水、16分後から30分後までは水：アセトニトリル(容量比)=10:0から85:15、31分後から45分後までは水：アセトニトリル=85:15から80:20になるようにグラジエントを掛けた。流速は3.0ml/min)を用いて脱塩処理を行ったところ、目的とする化合物3が81mg、化合物7が75mg得られた。

なお、得られた化合物3の物理的データは以下の通りである。

¹H-NMR(D₂O, 30℃)

7.99 (2H, d, Fmoc), 7.79 (2H, d, Fmoc), 7.55 (4H, m, Fmoc), 5.15 (1H, s, Man4-H₁), 5.06 (1H, d, GlcNAc1-H₁), 4.95 (1H, s, Man4'-H₁), 4.82 (1H, s, Man3-H₁), 4.69 (1H, d, GlcNAc2-H₁), 4.67 (2H, d, GlcNAc5, 5'-H₁), 4.53 (1H, d, Gal6'-H₁), 4.34 (1H, d, Man3-H₂), 4.27 (1H, d, Man4'-H₂), 4.19 (1H, d, Man4-H₂), 2.97 (1H, bdd, Asn- β CH), 2.76 (1H, dd, NeuAc7'-H_{3eq}), 2.61 (1H, bdd, Asn- β CH), 2.15 (15H, s \times 5, -Ac), 1.79 (1H, dd, NeuAc7'-H_{3ax}) ; HRMS Calcd for C₈₆H₁₂₇N₇NaO₅₃ [M+Na⁺] 2128.7356, found 2128.7363.

また、得られた化合物7の物理的データは以下の通りである。

¹H-NMR(D₂O, 30℃)

7.99 (2H, d, Fmoc), 7.79 (2H, d, Fmoc), 7.55 (4H, m, Fmoc), 5.15 (1H, s, Man4-H₁), 5.06 (1H, d, GlcNAc1-H₁), 4.95 (1H, s, Man4'-H₁), 4.82 (1H, s, Man3-H₁), 4.69 (1H, d, GlcNAc2-H₁), 4.67 (2H, d, GlcNAc5, 5'-H₁), 4.53 (1H, d, Gal6-H₁), 4.34 (1H, d, Man3-H₂), 4.27 (1H, d, Man4'-H₂), 4.19 (1H, d, Man4-H₂), 2.97 (1H, bdd, Asn- β CH), 2.76 (1H, dd, NeuAc7-H_{3eq}), 2.60 (1H, b dd, Asn- β CH), 2.15 (15H, s \times 5, -Ac), 1.79 (1H, dd, NeuAc7-H_{3ax}) ;
HRMS Calcd for C₈₆H₁₂₅N₇Na₃O₅₃[M+Na⁺] 2172.6995, found 2172.7084.

実施例4 化合物4および8の合成

実施例3で得られた化合物3および7の混合物(90mg, 47.3 μ mol)をそれぞれ分離することなく、ウシ血清アルブミン8mgと共にHEPES 緩衝溶液(50mM, pH6.0) 8.1mlに溶解させ、さらにBovine kidney 由来 β -グルコサミニダーゼ(シグマアルドリッヂ社製、from Bovine kidney)を2.88U加えた。この溶液を37°Cで18時間静置した後凍結乾燥し、残留物をHPLC(ODSカラム、2.0 ϕ \times 25cm、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液：メタノール=65:35、流速3ml/min)で精製したところ、117分後に第2図に示す化合物4が、127分後に化合物8が溶出した。それぞれを取り分け、凍結乾燥を行った。続いてHPLC(ODSカラム、2.0 ϕ \times 25cm、展開溶媒は最初の15分間が水、16分後から30分後までは水：アセトニトリル=10:0から85:15、31分後から45分後までは水：アセトニトリル=85:15から80:20になるようにグラジエントを掛けた。流速は3.0ml/min.)を用いて脱塩処理を行ったところ、目的とする化合物4が40mg、化合物8が37mg得られた。

なお、得られた化合物4の物理的データは以下の通りである。

¹H-NMR (D₂O、30°C)

8.01 (2H, d, Fmoc), 7.80 (2H, d, Fmoc), 7.56 (4H, m, Fmoc), 5.22 (1H, s, Man4-H₁), 5.08 (1H, d, GlcNAc1-H₁), 4.94 (1H, s, Man4'-H₁), 4.84 (1H, s,

Man3-H₁), 4.69 (1H, d, GlcNAc2-H₁), 4.67 (1H, d, GlcNAc5-H₁), 4.55 (1H, d, Gal6-H₁), 4.33 (1H, dd, Man3-H₂), 4.20 (1H, dd, Man4-H₂), 4.15 (1H, dd, Man4'-H₂), 2.97 (1H, bdd, Asn- β CH), 2.76 (2H, dd, NeuAc7, 7'-H_{3eq}), 2.62 (1H, bdd, Asn- β CH), 2.15 (12H, s \times 4, -Ac), 1.79 (2H, dd, NeuAc7, 7'-H_{3ax}) ; HRMS Calcd for C₇₈H₁₁₄N₆NaO₄₈[M+Na⁺] 1925.6562, found 1925.6539.

また、得られた化合物8の物理的データは以下の通りである。

¹H-NMR (D₂O, 30°C)

7.99 (2H, d, Fmoc), 7.79 (2H, d, Fmoc), 7.55 (4H, m, Fmoc), 5.15 (1H, s, Man4-H₁), 5.06 (1H, d, GlcNAc1-H₁), 4.95 (1H, s, Man4'-H₁), 4.82 (1H, s, Man3-H₁), 4.69 (1H, d, GlcNAc2-H₁), 4.67 (2H, d, GlcNAc5, 5'-H₁), 4.53 (2H, d, Gal6, 6'-H₁), 4.34 (1H, d, Man3-H₂), 4.27 (1H, d, Man4'-H₂), 2.97 (1H, bdd, Asn- β CH₂), 2.76 (1H, dd, NeuAc7'-H_{3eq}), 2.61 (1H, bdd, Asn- β CH₂), 2.15 (12H, s \times 4, -Ac), 1.79 (1H, dd, NeuAc7'-H_{3ax}) ; HRMS Calcd for C₇₈H₁₁₄N₆NaO₄₈[M+Na⁺] 1925.6562, found 1925.6533.

実施例5 化合物5の合成

実施例4で得られた化合物4 (30mg, 473 μ mol)とウシ血清アルブミン3mgをHEPES 緩衝溶液 (50mM, pH6.0) 6 mlに溶解させ、さらにJack Beans由来 α -マンノシダーゼを10U 加えた。この溶液を37°Cで21時間静置した後凍結乾燥し、続いてHPLC (ODSカラム、2.0 ϕ \times 25cm、展開溶媒は最初の15分間が水、16分後から30分後までは水：アセトニトリル=10:0 から85:15、31分後から45分後までは水：アセトニトリル=85:15から80:20になるようにグラジエントを掛けた。流速は3.0ml/min.) を用いて精製したところ、目的とする第1図に示す化合物5が20mg得られた。

なお、得られた化合物5の物理的データは以下の通りである。

¹H-NMR (D₂O, 30°C)

8.01 (2H, d, Fmoc), 7.80 (2H, d, Fmoc), 7.56 (4H, m, Fmoc), 5.00 (1H, d, GlcNAc1-H₁), 4.95 (1H, s, Man4'-H₁), 4.84 (1H, s, Man3-H₁), 4.67 (1H, d, GlcNAc2-H₁), 4.56 (1H, d, GlcNAc5-H₁), 4.44 (1H, d, Gal6-H₁), 4.11 (1H, dd, Man4'-H₂), 4.07 (1H, dd, Man3-H₂), 2.97 (1H, bdd, Asn- β CH), 2.76 (1H, dd, NeuAc7'-H_{3ea}), 2.62 (1H, bdd, Asn- β CH), 2.15 (12H, s \times 4, -Ac), 1.79 (2H, dd, NeuAc7'-H_{3ax}); HRMS Calcd for C₇₂H₁₀₄N₆NaO₄₃[M + Na⁺] 1763.6034, found 1763.6074.

実施例6 化合物9の合成

実施例4 で得られた化合物8 (40 mg, 630 μ mol)とウシ血清アルブミン5 mgをHEPES 緩衝溶液 (50mM, pH6.0) 7.8 mlに溶解させ、Jack Beans由来 α -マンノシダーゼを38 U加えた。この溶液を37°Cで63時間静置した後凍結乾燥し、続いてHPLCC (ODSカラム、2.0 ϕ \times 25cm、展開溶媒は最初の15分間が水、16分後から30分後までは水：アセトニトリル=10:0から85:15、31分後から45分後までは85:15から80:20 になるようにグラジエントを掛けた。流速は3.0 ml/min) を用いて精製したところ、目的とする化合物9が30 mg 得られた。

なお、得られた化合物9の物理的データは以下の通りである。

¹H-NMR (D₂O, 30°C)

8.01 (2H, d, Fmoc), 7.80 (2H, d, Fmoc), 7.56 (4H, m, Fmoc), 5.23 (1H, s, Man4-H₁), 5.08 (1H, d, GlcNAc1-H₁), 4.53 (1H, d, Gal6-H₁), 4.32 (1H, dd, Man3-H₂), 4.28 (1H, dd, Man4-H₂), 2.81 (1H, bdd, Asn- β CH), 2.76 (1H, d, NeuAc7-H_{3ea}), 2.59 (1H, bdd, Asn- β CH), 2.13 (12H, s \times 4, -Ac), 1.80 (1H, dd, NeuAc7-H_{3ax}); HRMS Calcd for C₇₂H₁₀₄N₆NaO₄₃[M + Na⁺] 1763.6034, found 1763.6041.

実施例7 Fmoc基の脱保護 (化合物33の合成)

実施例2で得られた化合物10 (10.5mg, 5.27 μ mol)を50%モルホリン/N,N-ジメチルホルムアミド溶液1.4mlに溶解させ、室温・アルゴン雰囲気下で2時間反応させた。この溶液にトルエン3mlを加え、35°Cでエバポレーターに供した。この操作を三回繰り返し、反応溶媒を取り除いた。残留物をゲルfiltrationカラムクロマトグラフィー (Sephadex G-25、2.5 ϕ × 30cm、展開溶媒は水、流速は1.0ml/min) で精製したところ、目的とする第3図に示す化合物33が7mg得られた (収率は76%)。なお、得られた化合物の構造は、実施例2から得られる化合物33と¹H-NMRスペクトルが一致したことから確認した。

化合物33の物理的データは以下の通りである。

¹H-NMR (30°C)

δ 5.12 (s, 1H, Man4-H-1), 5.07 (d, 1H, J = 9.7 Hz, GlcNAc1-H-1), 4.92 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.76 (s, 1H, Man3-H-1), 4.62 (d, 1H, J = 8.0 Hz, GlcNAc2-H-1), 4.58 (d, 2H, J = 7.8 Hz, GlcNAc5,5'-H-1), 4.47 (d, 2H, J = 7.9 Hz, Gal6,6'-H-1), 4.24 (bd, 1H, Man3-H-2), 4.19 (bdd, 1H, J = 3.2 Hz, 1.4 Hz, Man4'-H-2), 4.12 (bdd, 1H, J = 3.2 Hz, 1.4 Hz, Man4-H-2), 2.93 (dd, 1H, J = 4.5 Hz, 17.0 Hz, Asn- β CH), 2.93 (dd, 1H, J = 6.8 Hz, 17.0 Hz, Asn- β CH), 2.08 (s, 3H, Ac), 2.05 (s, 6H, Ac \times 2), 2.01 (s, 3H, Ac)

実施例8 化合物14の合成

化合物3 (28mg, 21.3 μ mol)とウシ血清アルブミン1.0mgをHEPES緩衝溶液 (50mM, pH5.0, 454 μ L)に溶解させ、ノイラミニダーゼ (シグマアルドリッヂ社製、from *Vibrio Cholerae*, 198mU)を加えた。この溶液を37°Cで20時間静置した後、HPLC分析により反応終了を確認した。反応溶液をHPLC (YMC Packed Column D-ODS-5 S-5 120A ODS No. 2020178、20 × 250mm、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液:アセトニトリル=80:20、流速4mL/min)で精製した。更にODSカラム (コスモシール75C₁₈-0PN、15 × 100mm、最初にH₂Oを50mL流し、次に25%アセトニトリ

ルを流して溶出させた)で脱塩したところ、目的とする化合物14(17mg、収率70%)が得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

¹H-NMR (30°C)

δ 7.91 (d, 2H, J = 7.5 Hz, Fmoc), 7.71 (d, 2H, J = 7.5 Hz, Fmoc), 7.51 (dd, 2H, J = 7.5 Hz, Fmoc), 7.43 (dd, 2H, J = 7.5 Hz, Fmoc), 5.12 (s, 1H, Man4-H-1), 4.99 (d, 1H, J = 9.5 Hz, GlcNAc1-H-1), 4.92 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.76 (s, 1H, Man3-H-1), 4.58 (d, 1H, J = 8.0 Hz, GlcNAc2-H-1), 4.55 (d, 1H, J = 8.4 Hz, GlcNAc5'-H-1), 4.47 (d, 1H, J = 7.8 Hz, Gal6'-H-1), 4.34 (t, 1H, Fmoc), 4.24 (bd, 1H, J = 1.9 Hz Man3-H-2), 4.18 (bdd, 1H, J = 1.4 Hz, 3.3 Hz, Man4-H-2), 4.11 (bdd, 1H, J = 1.4 Hz, 3.5 Hz, Man4'-H-2), 2.72 (bdd, 1H, J = 3.0 Hz, 15.7 Hz, Asn- β CH), 2.52 (bdd, 1H, J = 8.7 Hz, 15.7 Hz, Asn- β CH), 2.06, 2.05, 2.04, 1.89 (each s, each 3H, Ac); HRMS Calcd for $C_{75}H_{110}N_6NaO_{45} [M+Na^+]$ 1837.6402, found 1837.6471

実施例9 化合物19の合成

化合物7(20mg, 9.4 μ mol)とウシ血清アルブミン1.6mgをHEPES緩衝溶液 (50mM, pH5.0, 323 μ L) に溶解させ、ノイラミニダーゼ (シグマアルドリッヂ社製、*from Vibrio Cholerae*, 141mU) を加えた。この溶液を37°Cで18時間静置した後、HPLC分析により反応終了を確認した。続いてHPLC(YMC Packed Column D-ODS-5 S-5 120A ODS No. 2020178、20×250mm、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液: アセトニトリル=80:20、流速4mL/min)で精製した。更にODSカラム(コスモシール75C₁₈-0PN、15×100mm、最初にH₂Oを50mL流し、次に25%アセトニトリルを流して溶出させた)で脱塩したところ、目的とする化合物19(13mg、収率76%)を得た。得られた化合物の構造は¹H-NMRが標品と一致したことから確認した。

実施例10 化合物15の合成

化合物4(45mg, 24 μ mol)とウシ血清アルブミン1.7mgをHEPES緩衝溶液(50mM, pH5.0, 820 μ L)に溶解させ、ノイラミニダーゼ(シグマアルドリッヂ社製、*from Vibrio Cholerae*, 134mU)を加えた。この溶液を37°Cで14時間静置した後、HPLC分析により反応終了を確認した。続いて、反応溶液をHPLC(YMC Packed Column D-ODS-5 S-5 120A ODS No. 2020178, 20×250mm, 展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液:アセトニトリル=80:20、流速4mL/min)で精製した。更にODSカラム(コスモシール75C₁₈-OPN, 15×100mm、最初にH₂Oを50mL流し、次に25%アセトニトリルを流して溶出させた)で脱塩したところ、目的とする化合物15(28mg, 収率74%)が得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

¹H-NMR (30°C)

δ 7.92 (d, 2H, *J* = 7.5 Hz, Fmoc), 7.71 (d, 2H, *J* = 7.5 Hz, Fmoc), 7.51 (dd, 2H, *J* = 7.5 Hz, Fmoc), 7.44 (dd, 2H, *J* = 7.5 Hz, Fmoc), 5.10 (s, 1H, Man4-H-1), 4.99 (d, 1H, *J* = 9.5 Hz, GlcNAc1-H-1), 4.92 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.76 (s, 1H, Man3-H-1) 4.58 (d, 2H, GlcNAc2, 5'-H-1), 4.47 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, Gal6'-H-1), 4.35 (t, 1H, Fmoc), 4.24 (bd, 1H, *J* = 1.9 Hz, Man3-H-2), 4.11 (bs, 1H, Man4'-H-2), 4.07 (bs, 1H, Man4-H-2), 2.72 (bd, 1H, *J* = 15.5 Hz, Asn- β CH), 2.52 (bdd, 1H, *J* = 8.7 Hz, 15.5 Hz, Asn- β CH), 2.06, 2.04, 1.89 (each s, each 3H, Ac); HRMS Calcd for C₆₇H₉₇N₅NaO₄₀ [M + Na⁺] 1634.5608, found 1634.5564

実施例11 化合物70の合成

化合物15(11mg, 6.8 μ mol)とウシ血清アルブミン1.5mgをHEPES緩衝溶液(50mM, pH5.0, 269 μ L)に溶解させ、 β -ガラクトシダーゼ(生化学工業社製、*from Jack Beans*, 11 μ L, 275mU)を加えた。この溶液を37°Cで14時間静置した後、HPLC分析により反応終了を確認した。反応溶液をHPLC(YMC Packed Column D-

ODS-5 S-5 120A ODS No. 2020178、20×250mm、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル=80：20、流速4mL/min)で精製した。更にODSカラム(コスモシール75C₁₈-OPN、15×100mm、最初にH₂Oを50mL流し、次に25%アセトニトリルを流して溶出させた)で脱塩したところ、目的とする化合物70(6.3mg、収率64%)が得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

¹H-NMR (30°C)

δ 7.91 (d, 2H, J = 7.5 Hz, Fmoc), 7.70 (d, 2H, J = 7.5 Hz, Fmoc), 7.50 (dd, 2H, J = 7.5 Hz, Fmoc), 7.43 (dd, 2H, J = 7.5 Hz, Fmoc), 5.10 (s, 1H, Man4-H-1), 4.99 (d, 1H, J = 9.5 Hz, GlcNAc1-H-1), 4.91 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.76 (s, 1H, Man3-H-1), 4.55 (d, 2H, GlcNAc2, 5'-H-1), 4.32 (t, 1H, Fmoc), 4.24 (bs, 1H, Man3-H-2), 4.10 (bs, 1H, Man4-H-2), 4.06 (bs, 1H, J = 1.3 Hz, Man4'-H-2), 2.72 (bd, 1H, J = 14.0 Hz, Asn- β CH), 2.52 (bdd, 1H, J = 9.5 Hz, 14.8 Hz, Asn- β CH), 2.06, 2.05, 1.89 (each s, each 3H, Ac); MS(Fab) Calcd for C₆₁H₈₈N₅O₃₅[M+H⁺] 1450.5, found 1450.4

実施例12 化合物20の合成

化合物8(47mg, 25 μ mol)とウシ血清アルブミン1.9mgをHEPES緩衝溶液(50mM, pH5.0, 840 μ L)に溶解させ、ノイラミニダーゼ(シグマアルドリッヂ社製、*from Vibrio Cholerae*, 369mU)を加えた。この溶液を37°Cで37時間静置した後、HPLC分析により反応終了を確認した。反応溶液を凍結乾燥し、続いてHPLC(YMC Packed Column D-ODS-5 S-5 120A ODS No. 2020178、20×250mm、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル=80：20、流速4mL/min)で精製した。更にODSカラム(コスモシール75C₁₈-OPN、15×100mm、最初にH₂Oを50mL流し、次に25%アセトニトリルを流して溶出させた)で脱塩したところ、目的とする化合物20(26mg、収率65%)を得た。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

¹H-NMR (30°C)

δ 7.92 (d, 2H, J = 7.5 Hz, Fmoc), 7.71 (d, 2H, J = 7.5 Hz, Fmoc), 7.51 (dd, 2H, J = 7.5 Hz, Fmoc), 7.43 (dd, 2H, J = 7.5 Hz, Fmoc), 5.12 (s, 1H, Man4-H-1), 4.99 (d, 1H, J = 9.4 Hz, GlcNAc1-H-1), 4.91 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.77 (s, 1H, Man3-H-1), 4.57 (bd, 2H, GlcNAc2, 5'-H-1), 4.46 (d, 1H, J = 7.5 Hz, Gal6'-H-1), 4.34 (t, 3H, Fmoc), 4.24 (bs, 1H, Man4'-H-2), 4.19 (bs, 1H, Man4-H-2), 2.72 (bd, 1H, J = 15.5 Hz, Asn- β CH), 2.52 (bdd, 1H, J = 9.2 Hz, 15.5 Hz, Asn- β CH), 2.06, 2.05, 1.89 (each s, each 3H, Ac); HRMS Calcd for $C_{67}H_{97}N_5NaO_{40}[M+Na^+]$ 1634.5608, found 1634.5644

実施例13 化合物71の合成

化合物20(12mg, 7.4 μ mol)とウシ血清アルブミン1.0mgをHEPES緩衝溶液(50mM, pH5.0, 330 μ L)に溶解させ、 β -ガラクトシダーゼ(生化学工業社製、*from Jack Beans*, 12 μ L, 297mU)を加えた。この溶液を37°Cで46時間静置した後、HPLC分析により反応終了を確認した。反応溶液をHPLC(YMC Packed Column D-ODS-5 S-5 120A ODS No. 2020178、20×250mm、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル=80:20、流速4mL/min)で精製した。更にODSカラム(コスモシール75C₁₈-0PN、15×100mm。最初にH₂Oを50mL流し、次に25%アセトニトリルを流して溶出させた)で脱塩したところ、目的とする化合物71(6.6mg, 収率61%)が得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

¹H-NMR (30°C)

δ 7.90 (d, 2H, J = 7.5 Hz, Fmoc), 7.70 (d, 2H, J = 7.5 Hz, Fmoc), 7.49 (dd, 2H, J = 7.5 Hz, Fmoc), 7.42 (dd, 2H, J = 7.5 Hz, Fmoc), 5.11 (s, 1H, Man4-H-1), 4.99 (d, 1H, J = 9.4 Hz, GlcNAc1-H-1), 4.91 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.76 (s, 1H, Man3-H-1), 4.55 (d, 2H, GlcNAc2, 5-H-1), 4.31 (b, 1H, Fmoc), 4.24 (bs, 1H, Man3-H-2), 4.18 (bs, 1H, Man4-H-2), 3.97 (dd, 1H, J = 1.8 Hz, 3.3 Hz, Man4'-H-2), 2.72 (bd, 1H, J = 15.5 Hz, Asn- β CH), 2.52

(bdd, 1H, $J = 8.0$ Hz, 15.5 Hz, Asn- β CH), 2.06, 2.05, 1.88 (each s, each 3H, Ac); MS(Fab) Calcd for $C_{61}H_{88}N_5O_{35}[M+H^+]$ 1450.5, found 1450.3

実施例14 化合物16の合成

化合物5(32mg, 18.4 μ mol)とウシ血清アルブミン2.5mgをHEPES緩衝溶液(50mM, pH5.0, 713 μ L)に溶解させ、ノイラミニダーゼ(シグマアルドリッヂ社製、*from Vibrio Cholerae*, 134mU)を加えた。この溶液を37°Cで17時間静置した後、HPLC分析により反応終了を確認した。続いて、反応溶液をHPLC(YMC Packed Column D-ODS-5 S-5 120A ODS No. 2020178、20×250mm、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル=80:20、流速4mL/min)で精製した。更にODSカラム(コスモシール75C₁₈-OPN、15×100mm、最初にH₂Oを50mL流し、次に25%アセトニトリルを流して溶出させた)で脱塩したところ、目的とする化合物16(13mg, 収率52%)が得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

¹H-NMR (30°C)

δ 7.92 (d, 2H, $J = 7.5$ Hz, Fmoc), 7.71 (d, 2H, $J = 7.5$ Hz, Fmoc), 7.51 (dd, 2H, $J = 7.5$ Hz, Fmoc), 7.44 (dd, 2H, $J = 7.5$ Hz, Fmoc), 5.00 (d, 1H, $J = 9.9$ Hz, GlcNAc1-H-1), 4.92 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.75 (s, 1H, Man3-H-1), 4.58 (d, 2H, $J = 7.5$ Hz, GlcNAc2, 5'-H-1), 4.47 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz, Gal6'-H-1), 4.34 (t, 1H, Fmoc), 4.10 (bd, 1H, Man3-H-2), 4.07 (bs, 1H, Man4'-H-2), 2.72 (bdd, 1H, $J = 15.5$ Hz, Asn- β CH), 2.52 (bdd, 1H, $J = 9.2$ Hz, 15.5 Hz, Asn- β CH), 2.07, 2.05, 1.89 (each s, each 3H, Ac); MS(Fab) Calcd for $C_{61}H_{88}N_5O_{35}[M+H^+]$ 1450.5, found 1450.3.

実施例15 化合物17の合成

化合物16(9mg, 6.2 μ mol)とウシ血清アルブミン1.6mgをHEPES緩衝溶液(50mM,

pH5.0, 613 μ L) に溶解させ、 β -ガラクトシダーゼ (生化学工業社製、*from Jack Beans*, 186mU) を加えた。この溶液を37°Cで32時間静置した後、HPLC分析により反応終了を確認した。反応溶液をHPLC(YMC Packed Column D-ODS-5 S-5 120A ODS No. 2020178、20×250mm、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル=80:20、流速4mL/min)で精製した。更にODSカラム(コスモシール75C₁₈-OPN、15×100mm、最初にH₂Oを50mL流し、次に25%アセトニトリルを流して溶出させた)で脱塩したところ、目的とする化合物17(5.4mg, 収率68%)が得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

¹H-NMR (30°C)

δ 7.89 (d, 2H, J = 7.5 Hz, Fmoc), 7.68 (d, 2H, J = 7.5 Hz, Fmoc), 7.49 (dd, 2H, J = 7.5 Hz, Fmoc), 7.42 (dd, 2H, J = 7.5 Hz, Fmoc), 4.99 (d, 1H, J = 9.7 Hz, GlcNAc1-H-1), 4.91 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.55 (d, 1H, J = 8.1 Hz, GlcNAc2,5'-H-1), 4.09, 4.07 (s, 1H, Man4'-H-2, Man3-H-2), 2.72 (bd, 1H, J = 15.5 Hz Asn- β CH), 2.56 (bdd, 1H, J = 8.1 Hz, 15.5 Hz, Asn- β CH), 2.07, 2.05, 1.89 (each s, each 3H, Ac); MS(Fab) Calcd for C₅₅H₇₇N₅NaO₃₀[M+Na⁺] 1310.5, found 1310.2

実施例16 化合物18の合成

化合物17(3.4mg, 2.6 μ mol)とウシ血清アルブミン1.1mgをHEPES緩衝溶液(50mM, pH5.0, 257 μ L)に溶解させ、*N*-アセチル- β -D-グルコサミニダーゼ(シグマアルドリッヂ *from Jack Beans*, 144mU)加えた。この溶液を37°Cで24時間静置した後、HPLC分析により反応終了を確認した。反応溶液をHPLC(YMC Packed Column D-ODS-5 S-5 120A ODS No. 2020178、20×250mm、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル=80:20、流速4mL/min)で精製した。更にODSカラム(コスモシール75C₁₈-OPN、15×100mm、最初にH₂Oを50mL流し、次に25%アセトニトリルを流して溶出させた)で脱塩したところ、目的とする化合物

18 (2.1mg, 収率75%)が得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

¹H-NMR (30°C)

δ 7.91 (d, 2H, J = 7.5 Hz, Fmoc), 7.71 (d, 2H, J = 7.5 Hz, Fmoc), 7.51 (dd, 2H, J = 7.5 Hz, 7.5 Hz, Fmoc), 7.43 (dd, 2H, J = 7.5 Hz, 7.5 Hz, Fmoc), 5.00 (d, 1H, J = 9.7 Hz, GlcNAc1-H-1), 4.91 (d, 1H, J = 1.6 Hz, Man4'-H-1), 4.76 (s, 1H, Man3-H-1), 4.58 (d, 1H, J = 7.8 Hz, GlcNAc2-H-1), 4.34 (t, 1H, Fmoc), 4.07 (d, 1H, J = 2.7 Hz, Man4'-H-2), 3.97 (dd, 1H, J = 1.6 Hz, 3.7 Hz, Man3-H-2), 2.72 (bdd, 1H, J = 3.2 Hz, 15.1 Hz, Asn- β CH), 2.52 (bdd, 1H, J = 8.9 Hz, 15.1 Hz, Asn- β CH), 2.07, 1.89 (each s, each 3H, Ac); MS (Fab) Calcd for $C_{47}H_{65}N_4O_{25}[M+Na^+]$ 1085.4, found 1085.3

実施例17 化合物21の合成

化合物9 (28mg, 16 μ mol) とウシ血清アルブミン1.7mgをHEPES緩衝溶液 (50mM, pH5.0, 624 μ L) に溶解させ、ノイラミニダーゼ (シグマアルドリッヂ社製、*from Vibrio Cholerae*, 117mU) を加えた。この溶液を37°Cで17時間静置した後、HPLC分析により反応終了を確認した。続いて、反応溶液をHPLC (YMC Packed Column D-ODS-5 S-5 120A ODS No. 2020178, 20×250mm, 展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液:アセトニトリル=80:20、流速4mL/min) で精製した。更にODSカラム (コスモシール75C₁₈-OPN, 15×100mm。最初にH₂Oを50mL流し、次に25%アセトニトリルを流して溶出させた) で脱塩したところ、目的とする化合物21 (14.6mg, 収率68%) が得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

¹H-NMR (30°C)

δ 7.92 (d, 2H, J = 7.5 Hz, Fmoc), 7.71 (d, 2H, J = 7.5 Hz, Fmoc), 7.50

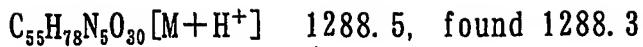
(dd, 2H, $J = 7.5$ Hz, Fmoc), 7.43 (dd, 2H, $J = 7.5$ Hz, Fmoc), 5.12 (s, 1H, Man4-H-1), 4.99 (d, 1H, $J = 9.5$ Hz, GlcNAc1-H-1), 4.77 (s, 1H, Man3-H-1), 4.57 (d, 2H, $J = 7.2$ Hz, GlcNAc2-H-1), 4.46 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz, Gal6-H-1), 4.34 (t, 1H Fmoc), 4.22 (bd, 1H, $J = 2.7$ Hz, Man3-H-2), 4.19 (b, 1H, Man4-H-2), 2.72 (bdd, 1H, $J = 15.5$ Hz, Asn- β CH), 2.52 (bdd, 1H, $J = 9.8$ Hz, 15.5 Hz, Asn- β CH), 2.05 (s, 6H, Ac \times 2), 1.89 (s, 3H, Ac); MS(Fab) Calcd for $C_{61}H_{88}N_5O_{35} [M + H^+]$ 1450.5, found 1450.3

実施例18 化合物22の合成

化合物21(10mg, 6.9 μ mol)とウシ血清アルブミン1.6mgをHEPES緩衝溶液(50mM, pH5.0, 672 μ L)に溶解させ、 β -ガラクトシダーゼ(生化学工業社製、*from Jack Beans*, 205mU)を加えた。この溶液を37°Cで20時間静置した後、HPLC分析により反応終了を確認した。反応溶液をHPLC(YMC Packed Column D-ODS-5 S-5 120A ODS No. 2020178、20 \times 250mm、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル=80:20、流速4mL/min)で精製した。更にODSカラム(コスモシール75C₁₈-OPN、15 \times 100mm、最初にH₂Oを50mL流し、次に25%アセトニトリルを流して溶出させた)で脱塩したところ、目的とする化合物22(5.6mg, 収率64%)が得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

¹H-NMR (30°C)

δ 7.87 (d, 2H, $J = 7.5$ Hz, Fmoc), 7.67 (d, 2H, $J = 7.5$ Hz, Fmoc), 7.48 (dd, 2H, $J = 7.5$ Hz, Fmoc), 7.41 (dd, 2H, $J = 7.5$ Hz, Fmoc), 5.12 (s, 1H, Man4-H-1), 4.99 (d, 1H, $J = 9.7$ Hz, GlcNAc1-H-1), 4.76 (s, 1H, Man3-H-1), 4.55 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz, GlcNAc2,5-H-1), 4.26 (t, 1H, Fmoc), 4.22 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz, Man3-H-2), 4.18 (bdd, 1H, $J = 1.3$ Hz, 3.3 Hz, Man4-H-2), 2.72 (bd, 1H, $J = 15.5$ Hz, Asn- β CH), 2.54 (bdd, 1H, $J = 9.5$ Hz, 15.5 Hz, Asn- β CH), 2.05 (s, 6H, Ac \times 2), 1.88 (s, 3H, Ac); MS(Fab) Calcd for



実施例 19 化合物23の合成

化合物22(3.6mg, 2.8 μmol)とウシ血清アルブミン1.2mgをHEPES緩衝溶液(50mM, pH5.0, 277 μL)に溶解させ、N-アセチル- β -D-グルコサミニダーゼ(シグマアルドリッヂ from Jack Beans, 195mU)を加えた。この溶液を37°Cで24時間静置した後、HPLC分析により反応終了を確認した。反応溶液をHPLC(YMC Packed Column D-ODS-5 S-5 120A ODS No. 2020178、20×250mm、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル=80:20、流速4mL/min)で精製した。更にODSカラム(コスモシール75C₁₈-OPN、15×100mm、最初にH₂Oを50mL流し、次に25%アセトニトリルを流して溶出させた)で脱塩したところ、目的とする化合物23(2.3mg, 収率77%)が得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

¹H-NMR (30°C)

δ 7.91 (d, 2H, J = 7.5 Hz, Fmoc), 7.70 (d, 2H, J = 7.5 Hz, Fmoc), 7.50 (dd, 2H, J = 7.5 Hz, Fmoc), 7.43 (dd, 2H, J = 7.5 Hz, Fmoc), 5.11 (s, 1H, Man4-H-1), 4.99 (d, 1H, J = 9.7 Hz, GlcNAc1-H-1), 4.77 (s, 1H, Man3-H-1), 4.57 (d, 1H, J = 6.5 Hz, GlcNAc-H-1), 4.33 (t, 1H, Fmoc), 4.22 (d, 1H, J = 3.0 Hz, Man3-H-2), 4.07 (bdd, 1H, J = 2.1 Hz, Man4-H-2), 2.72 (bdd, 1H, J = 15.5 Hz, Asn- β CH), 2.52 (bdd, 1H, J = 8.9 Hz, 15.5 Hz, Asn- β CH), 2.05, 1.89 (each s, each 3H, Ac); MS(Fab) Calcd for $\text{C}_{47}\text{H}_{65}\text{N}_4\text{O}_{25}[\text{M} + \text{H}^+]$ 1085.4, found 1085.3

実施例 20 化合物11の合成

化合物10(123mg, 62 μmol)とウシ血清アルブミン(1.1mg)をHEPES緩衝溶液(50mM, pH5.0, 2.5mL)に溶解させ、 β -ガラクトシダーゼ(生化学工業社製、

from Jack Beans, 24 μ L, 612mU) を加えた。この溶液を37°Cで61時間静置した後、HPLC分析により反応終了を確認した。反応溶液を凍結乾燥し、続いてHPLC(YMC Packed Column D-ODS-5 S-5 120A ODS No. 2020178、20×250mm、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル=80:20、流速3.5mL/min)で精製した。更にODSカラム(コスモシール75C₁₈-OPN、15×100mm。最初にH₂Oを50mL流し、次に25%アセトニトリルを流して溶出させた)で脱塩したところ、目的とする化合物11(71mg、収率70%)が得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

¹H-NMR (30°C)

δ 7.91 (d, 2H, J = 7.5 Hz, Fmoc), 7.71 (d, 2H, J = 7.5 Hz, Fmoc), 7.50 (dd, 2H, J = 7.5 Hz, Fmoc), 7.43 (dd, 2H, J = 7.5 Hz, Fmoc), 5.11 (s, 1H, Man4-H-1), 4.99 (1H, d, J = 9.9 Hz, GlcNAc1-H-1), 4.91 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.76 (s, 1H, Man3-H-1), 4.55 (d, 2H, J = 8.6 Hz, GlcNAc2,5-H-1), 4.34 (t, 1H, Fmoc), 4.24 (s, 1H, Man3-H-2), 4.18 (s, 1H, Man4-H-2), 4.10 (s, 1H, Man4'-H-2), 2.72 (bd, 1H, J = 15.5 Hz, Asn- β CH), 2.51 (bdd, 1H, J = 9.0 Hz, 15.5 Hz, Asn- β CH), 2.06 (s, 3H, Ac), 2.05 (s, 6H, Ac×2), 1.88 (s, 3H, Ac); HRMS Calcd for C₆₉H₁₀₀N₆NaO₄₀[M+Na⁺] 1675.5873, found 1675.5841

実施例21 化合物12の合成

化合物11(50mg, 30 μ mol)とウシ血清アルブミン2.0mgをHEPES緩衝溶液(50mM, pH5.0, 920 μ L)に溶解させ、N-アセチル- β -D-グルコサミニダーゼ(シグマアルドリッヂ社製、from Jack Beans, 2.1U)を加えた。この溶液を37°Cで48時間静置した後、HPLC分析により反応終了を確認した。反応溶液をHPLC(YMC Packed Column D-ODS-5 S-5 120A ODS No. 2020178、20×250mm、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル=80:20、流速4mL/min)で精製し、凍結乾

燥を行った。この残留物をODSカラム(コスモシール75C₁₈-OPN、15×100mm、最初にH₂Oを50mL流し、次に25%アセトニトリルを流して溶出させた)で脱塩したところ、目的とする化合物12(25mg、収率66%)が得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

¹H-NMR (30°C)

δ 7.91 (d, 2H, *J* = 7.5 Hz, Fmoc), 7.70 (d, 2H, *J* = 7.5 Hz, Fmoc), 7.50 (dd, 2H, *J* = 7.5 Hz, Fmoc), 7.43 (dd, 2H, *J* = 7.5 Hz, Fmoc), 5.10 (s, 1H, Man4-H-1), 4.99 (d, 1H, *J* = 9.7 Hz, GlcNAc1-H-1), 4.91 (bd, 1H, *J* = 1.6 Hz, Man4'-H-1), 4.77 (s, 1H, Man3-H-1), 4.58~4.52 (b, 1H, GlcNAc2-H-1), 4.33 (t, 1H, Fmoc), 4.24 (bs, 1H, Man3-H-2), 4.06 (dd, 1H, *J* = 1.6 Hz, 3.2 Hz, Man4-H-2), 3.97 (dd, 1H, *J* = 1.6 Hz, 3.5 Hz, Man4'-H-2), 2.72 (bd, 1H, *J* = 15.5 Hz, Asn-β CH), 2.53 (bdd, 1H, *J* = 9.0 Hz, 15.5 Hz, Asn-β CH), 2.05, 1.88 (each s, each 3H, Ac)

実施例22 化合物13の合成

化合物12(10mg, 11 μmol)とウシ血清アルブミン0.9mgをHEPES緩衝溶液(50mM, pH5.0, 440 μL)に溶解させ、α-マンノシダーゼ(シグマアルドリッヂ社製、*from Jack Beans*, 30 μL, 3.2U)を加えた。この溶液を37°Cで21時間静置した後、HPLC分析により反応終了を確認した。続いてHPLC(YMC Packed Column D-ODS-5 S-5 120A ODS No. 2020178、20×250mm、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル=80:20、流速4mL/min)で精製を行った。更にODSカラム(コスモシール75C₁₈-OPN、15×100mm、最初にH₂Oを50mL流し、次に25%アセトニトリルを流して溶出させた)で脱塩したところ、目的とする化合物13(3mg、収率43%)を得た。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

¹H-NMR (30°C)

δ 7.92 (d, 2H, *J* = 7.5 Hz, Fmoc), 7.71 (d, 2H, *J* = 7.5 Hz, Fmoc), 7.51

(dd, 2H, $J = 7.5$ Hz, Fmoc), 7.43 (dd, 2H, $J = 7.5$ Hz, Fmoc), 4.99 (d, 1H, $J = 9.5$ Hz, GlcNAc1-H-1), 4.76 (s, 1H, Man3-H-1), 4.57 (1H, GlcNAc2-H-1), 4.06 (d, 1H, $J = 3.2$ Hz, Man3-H-2), 2.72 (bd, 1H, $J = 15.5$ Hz, Asn- β CH), 2.52 (bdd, 1H, $J = 8.3$ Hz, 15.5 Hz, Asn- β CH), 2.05, 1.89 (each s, each 3H, Ac)

(糖鎖アスパラギン誘導体のFmoc基の脱保護)

以下、全ての糖鎖アスパラギン誘導体において、以下の手順でFmoc基の脱保護を行った。まず、糖鎖アスパラギンFmoc体 $1\mu\text{mol}$ あたりに $240\mu\text{L}$ の N,N -ジメチルホルムアミド、 $160\mu\text{L}$ のモルホリンを加え、室温・アルゴン雰囲気下で反応させた。TLC（展開溶媒として1M 酢酸アンモニウム：イソプロパノール=8:5を用いた）にて反応終了を確認した後、氷水で冷却した。ここにジエチルエーテルを反応溶液の10倍量加えて15分間攪拌した後、析出した沈殿物をろ別した。得られた残渣を水に溶解させ、 35°C でエバポレートした。更にトルエンを3mL加えエバポレートするという操作を三回繰り返した。残留物を逆相カラムクロマトグラフィー（コスモシール 75C_{18} -OPN、 $15\times 100\text{mm}$ 、展開溶媒は水）により精製した。

実施例23 化合物33の合成

化合物10（ 10.5mg , $5.3\mu\text{mol}$ ）を上記の操作で7時間反応させたところ、目的とする化合物33（ 7mg , 収率76%）が得られた。得られた化合物は $^1\text{H-NMR}$ が標品と一致したことから確認した。

実施例24 化合物26の合成

化合物3（ 8.0mg , $3.8\mu\text{mol}$ ）を上記の操作で21時間反応させたところ、目的とする化合物26（ 6.3mg , 収率88%）が得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

¹H-NMR (30°C)

δ 5.13 (s, 1H, Man4-H-1), 5.07 (d, 1H, J = 9.9 Hz, GlcNAc1-H-1), 4.95 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.78 (s, 1H, Man3-H-1), 4.62 (2H, GlcNAc2,5'-H-1), 4.56 (d, 1H, J = 8.1 Hz, GlcNAc5-H-1), 4.52 (d, 1H, J = 7.8 Hz, Gal6'-H-1), 4.25 (bs, 1H, Man3-H-2), 4.19 (bs, 1H, Man4'-H-2), 4.12 (bs, 1H, Man4-H-2), 2.94 (dd, 1H, J = 4.5 Hz, 17.0 Hz, Asn- β CH), 2.85 (dd, 1H, J = 6.8 Hz, 17.0 Hz, Asn- β CH), 2.68 (dd, 1H, J = 4.6 Hz, 12.4 Hz, NeuAc7'-H-3_{eq}), 2.08, 2.07, 2.06, 2.04, 2.02 (each s, each 3H, Ac), 1.72 (dd, 1H, J = 12.1 Hz, 12.1 Hz, NeuAc7'-H-3_{ax}); MS(Fab) Calcd for C₇₁H₁₁₈N₇O₅₁[M + H⁺] 1884.7, found 1884.5

実施例 25 化合物27の合成

化合物4(11.0mg, 5.8 μ mol)を上記の操作で23時間反応させたところ、目的とする化合物27(8.5mg, 収率88%)で得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

¹H-NMR (30°C)

δ 5.11 (s, 1H, Man4-H-1), 5.08 (d, 1H, J = 9.7 Hz, GlcNAc1-H-1), 4.95 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.78 (s, 1H, Man3-H-1), 4.62 (d, 2H, GlcNAc2,5'-H-1), 4.45 (d, 1H, J = 7.6 Hz, Gal6'-H-1), 4.26 (bd, 1H, Man3-H-2), 4.12 (bd, 1H, Man4'-H-2), 4.08 (bdd, 1H, J = 1.6 Hz, 3.3 Hz, Man4-H-2), 2.94 (dd, 1H, J = 4.0 Hz, 17.2 Hz, Asn- β CH), 2.85 (dd, 1H, J = 7.2 Hz, 17.2 Hz, Asn- β CH), 2.68 (dd, 1H, J = 4.1 Hz, 12.1 Hz, NeuAc7'-H-3_{eq}), 2.09, 2.07, 2.04, 2.02 (each s, each 3H, Ac), 1.72 (dd, 1H, J = 12.1 Hz, 12.1 Hz, NeuAc7'-H-3_{ax}); MS(Fab) Calcd for C₆₃H₁₀₄N₆NaO₄₆[M + Na⁺] 1703.6, found 1703.

実施例26 化合物28の合成

化合物5(7.0mg, 4.0 μmol)を上記の操作で21時間反応させたところ、目的とする化合物28(5.3mg、収率87%)が得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

$^1\text{H-NMR}$ (30°C)

δ 5.07 (d, 1H, $J = 9.4$ Hz, GlcNAc1-H-1), 4.94 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.76 (s, 1H, Man3-H-1), 4.61, 4.59 (each d, each 1H, GlcNAc2, 5'-H-1), 4.44 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz, Gal6'-H-1), 4.10, 4.07 (each 1H, Man4', 3-H-2), 2.93 (dd, 1H, $J = 4.6$ Hz, 17.5 Hz, Asn- β CH), 2.85 (dd, 1H, $J = 7.0$ Hz, 17.5 Hz, Asn- β CH), 2.67 (dd, 1H, $J = 4.6$ Hz, 12.2 Hz, NeuAc7'-H-3_{eq}), 2.08, 2.06, 2.02, 2.01 (each s, each 3H, Ac), 1.71 (2H, dd, $J = 12.2$ Hz, 12.2 Hz, NeuAc7'-H-3_{ax}); MS(Fab) Calcd for $\text{C}_{57}\text{H}_{94}\text{N}_6\text{NaO}_{41}[\text{M} + \text{Na}^+]$ 1541.5, found 1541.3

実施例27 化合物30の合成

化合物7(13.9mg, 6.6 μmol)を上記の操作で7時間反応させたところ、目的とする化合物30(8.0mg、収率64%)を得た。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

$^1\text{H-NMR}$ (30°C)

δ 5.13 (s, 1H, Man4-H-1), 5.06 (d, 1H, $J = 9.9$ Hz, GlcNAc1-H-1), 4.91 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.77 (s, 1H, Man3-H-1), 4.61, 4.60 (each d, each 1H, $J = 8.0$ Hz, GlcNAc2, 5-H-1), 4.55 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, GlcNAc5'-H-1), 4.44 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, Gal6-H-1), 4.24 (bd, 1H, Man3-H-2), 4.19 (bdd, 1H, $J = 1.3$ Hz, 3.2 Hz, Man4'-H-2), 4.10 (bdd, 1H, $J = 1.4$ Hz, 3.2 Hz, Man4-H-2), 2.90 (dd, 1H, $J = 4.5$ Hz, 16.7 Hz, Asn- β CH), 2.80 (dd, 1H, $J = 7.5$ Hz, 16.7 Hz, Asn- β CH), 2.66 (dd, 1H, $J = 4.6$ Hz, 12.4 Hz, NeuAc7-H-3_{eq}),

2.07, 2.06, 2.05, 2.02, 2.01 (each s, each 3H, Ac), 1.71 (dd, 1H, J = 12.4 Hz, 12.4 Hz, NeuAc7-H-3_{ax}); MS(Fab) Calcd for C₇₁H₁₁₇N₇NaO₅₁[M+Na⁺] 1906.7, found 1906.1

実施例 2 8 化合物31の合成

化合物8(8.0mg, 4.2 μ mol)を上記の操作で12時間反応させたところ、目的とする化合物31(6.0mg, 収率86%)を得た。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

¹H-NMR (30°C)

δ 5.12 (s, 1H, Man4-H-1), 5.06 (d, 1H, J = 9.5 Hz, GlcNAc1-H-1), 4.91 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.77 (s, 1H, Man3-H-1), 4.61, 4.59 (each d, each 1H, GlcNAc2, 5-H-1), 4.43 (d, 1H, J = 8.0 Hz, Gal6-H-1), 4.24 (bd, 1H, Man3-H-2), 4.18 (bdd, 1H, Man4'-H-2), 2.91 (bd, 1H, J = 17.0 Hz, Asn- β CH), 2.81 (dd, 1H, J = 6.5 Hz, 17.0 Hz, Asn- β CH), 2.66 (dd, 1H, J = 4.6 Hz, 12.6 Hz, NeuAc7-H-3_{eq}), 2.06, 2.06, 2.02, 2.00 (each s, each 3H, Ac), 1.70 (dd, 1H, J = 12.6 Hz, 12.6 Hz, NeuAc7-H-3_{ax}); MS(Fab) Calcd for C₆₃H₁₀₄N₆NaO₄₆[M+Na⁺] 1703.6, found 1703.0

実施例 2 9 化合物32の合成

化合物9(7.7mg, 4.4 μ mol)を上記の操作で23時間反応させたところ、目的とする化合物32(5.2mg, 収率78%)で得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

¹H-NMR (30°C)

δ 5.14 (s, 1H, Man4-H-1), 5.07 (d, 1H, J = 9.4 Hz, GlcNAc1-H-1), 4.78 (s, 1H, Man3-H-1), 4.61, 4.60 (each d, each 1H, GlcNAc2, 5-H-1), 4.44 (d, 1H, J = 8.0 Hz, Gal6-H-1), 4.23 (d, 1H, J = 3.0 Hz, Man3-H-2), 4.19 (bdd, 1H,

J = 1.3 Hz, 2.9 Hz, Man4-H-2), 2.92 (dd, 1H, *J* = 4.1 Hz, 17.2 Hz, Asn- β CH), 2.83 (dd, 1H, *J* = 7.5 Hz, 12.7 Hz, Asn- β CH), 2.67 (dd, 1H, *J* = 4.6 Hz, 12.7 Hz, NeuAc7-H-3_{eq}), 2.06 (s, 6H, Ac \times 2), 2.03, 2.01 (each s, each 3H, Ac) 1.71 (dd, 1H, *J* = 12.7 Hz, 12.7 Hz, NeuAc7-H-3_{ax}); MS(Fab) Calcd for C₅₇H₉₄N₆NaO₄₁[M+Na⁺] 1541.5, found 1541.2

実施例30 化合物37の合成

化合物14(9.1mg, 5.0 μ mol)を上記の操作で13時間反応させたところ、目的とする化合物37(6.5mg, 収率77%)で得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

¹H-NMR (30°C)

δ 5.11 (s, 1H, Man4-H-1), 5.06 (d, 1H, *J* = 9.5 Hz, GlcNAc1-H-1), 4.92 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.75 (s, 1H, Man3-H-1), 4.61, 4.57, 4.55 (each d, each 1H, *J* = 7.5 Hz, GlcNAc2, 5, 5'-H-1), 4.46 (d, 1H, *J* = 7.3 Hz, Ga16'-H-1), 4.23 (bs, 1H, Man3-H-2), 4.18 (bs, 1H, Man4'-H-2), 4.10 (bs, 1H, Man4-H-2), 2.87 (dd, 1H, *J* = 4.8 Hz, 17.0 Hz, Asn- β CH), 2.76 (dd, 1H, *J* = 7.2 Hz, 17.0 Hz, Asn- β CH), 2.07 (s, 3H, Ac), 2.04 (s, 6H, Ac \times 2), 2.00 (s, 3H, Ac); MS(Fab) Calcd for C₆₀H₁₀₀N₆NaO₄₃[M+Na⁺] 1615.6, found 1615.0

実施例31 化合物42の合成

化合物19(9.8mg, 5.4 μ mol)を上記の操作で13時間反応させたところ、目的とする化合物42(8.0mg, 収率88%)で得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

¹H-NMR (30°C)

δ 5.11 (s, 1H, Man4-H-1), 5.06 (d, 1H, *J* = 9.5 Hz, GlcNAc1-H-1), 4.91 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.76 (s, 1H, Man3-H-1), 4.60, 4.57, 4.55 (each d,

each 1H, GlcNAc2, 5, 5'-H-1), 4.46 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz, Gal6-H-1), 4.28 (s, 1H, Man3-H-2), 4.18 (s, 1H, Man4'-H-2), 4.10 (s, 1H, Man4-H-2), 2.88 (dd, 1H, $J = 4.0$ Hz, 16.6 Hz, Asn- β CH), 2.77 (dd, 1H, $J = 7.5$ Hz, 16.6 Hz, Asn- β CH), 2.07 (s, 3H, Ac), 2.04 (s, 6H, Ac $\times 2$), 2.00 (s, 3H, Ac); MS (Fab) Calcd for $C_{60}H_{101}N_6O_{43} [M+H^+]$ 1593.6, found 1593.8

実施例32 化合物38の合成

化合物15 (5.1mg, 3.2 μ mol) を上記の操作で11時間反応させたところ、目的とする化合物38 (4.0mg, 収率91%) が得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

1H -NMR (30°C)

δ 5.10 (s, 1H, Man4-H-1), 5.07 (d, 1H, $J = 9.4$ Hz, GlcNAc1-H-1), 4.92 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.76 (s, 1H, Man3-H-1), 4.61, 4.57 (each d, each 1H, $J = 7.8$ Hz, GlcNAc2, 5'-H-1), 4.47 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz, Gal6'-H-1), 4.24 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz, Man3-H-2), 4.10, 4.06 (each bd, each 1H, Man4', 4-H-2), 2.90 (dd, 1H, $J = 4.2$ Hz, 16.8 Hz, Asn- β CH), 2.81 (dd, 1H, $J = 7.3$ Hz, 16.8 Hz, Asn- β CH), 2.07, 2.04, 2.01 (each s, each 3H, Ac); MS (Fab) Calcd for $C_{52}H_{88}N_5O_{38} [M+H^+]$ 1390.5, found 1390.1

実施例33 化合物72の合成

化合物70 (4.0mg, 2.8 μ mol) を上記の操作で13時間反応させたところ、目的とする化合物72 (2.9mg, 収率85%) が得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

1H -NMR (30°C)

δ 5.09 (s, 1H, Man4-H-1), 5.06 (d, 1H, $J = 9.8$ Hz, GlcNAc1-H-1), 4.91 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.76 (s, 1H, Man3-H-1), 4.61, 4.54 (each d, each 1H,

GlcNAc2, 5-H-1), 4.24 (s, 1H, Man3-H-2), 4.10, 4.06 (each bs, each 1H, Man4, 4'-H-2), 2.87 (dd, 1H, $J = 17.2$ Hz, Asn- β CH), 2.76 (dd, 1H, $J = 6.5$ Hz, 17.2 Hz, Asn- β CH), 2.07, 2.04, 2.00 (each s, each 3H, Ac); MS(Fab) Calcd for $C_{46}H_{78}N_5O_{33}[M+H^+]$ 1228.5, found 1228.3

実施例3 4 化合物43の合成

化合物20 (5.4mg, 3.3 μ mol)を上記の操作で11時間反応させたところ、目的とする化合物43 (4.1mg, 収率87%)で得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

1H -NMR (30°C)

δ 5.11 (s, 1H, Man4-H-1), 5.07 (d, 1H, $J = 9.5$ Hz, GlcNAc1-H-1), 4.91 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.77 (s, 1H, Man3-H-1), 4.61, 4.57 (each d, each 1H, GlcNAc2, 5-H-1), 4.46 (d, 1H, Gal6-H-1), 4.24 (s, 1H, Man3-H-2), 4.18 (bs, 1H, Man4-H-2) 2.90 (dd, 1H, $J = 4.0$ Hz, 17.0 Hz, Asn- β CH), 2.80 (dd, 1H, $J = 7.3$ Hz, 17.0 Hz, Asn- β CH), 2.07, 2.04, 2.01 (each s, each 3H, Ac); MS(Fab) Calcd for $C_{52}H_{88}N_5O_{38}[M+H^+]$ 1390.5, found 1390.2

実施例3 5 化合物73の合成

化合物71 (4.0mg, 2.8 μ mol)を上記の操作で13時間反応させたところ、目的とする化合物73 (2.9mg, 収率85%)で得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

1H -NMR (30°C)

δ 5.11 (s, 1H, Man4-H-1), 5.06 (d, 1H, $J = 9.9$ Hz, GlcNAc1-H-1), 4.91 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.77 (s, 1H, Man3-H-1), 4.60, 4.54 (each d, each 1H, $J = 7.9$ Hz, GlcNAc2, 5-H-1), 4.24 (s, 1H, Man3-H-2), 4.18 (dd, 1H, $J = 1.6$ Hz, 1.6 Hz, Man4-H-2), 3.96 (1H, dd, $J = 1.6$ Hz, 1.6 Hz, Man4-H-2),

2.88 (dd, 1H, $J = 4.3$ Hz, 16.8 Hz, Asn- β CH), 2.77 (dd, 1H, $J = 7.2$ Hz, 16.8 Hz, Asn- β CH), 2.06, 2.04, 2.00 (each s, each 3H, Ac); MS(Fab) Calcd for $C_{46}H_{78}N_5O_{33}[M + H^+]$ 1228.5, found 1228.3

実施例 3 6 化合物39の合成

化合物16(2.2mg, 1.5 μ mol)を上記の操作で7時間反応させたところ、目的とする化合物39(1.6mg, 収率84%)で得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

1H -NMR (30°C)

δ 5.07 (d, 1H, $J = 9.7$ Hz, GlcNAc1-H-1), 4.92 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.75 (s, 1H, Man3-H-1), 4.62, 4.58 (each d, each 1H, GlcNAc2,5-H-1), 4.09, 4.08 (each s, each 1H, Man3,4'-H-2), 2.91 (dd, 1H, $J = 4.1$ Hz, 16.9 Hz, Asn- β CH), 2.81 (dd, 1H, $J = 6.8$ Hz, 16.9 Hz, Asn- β CH), 2.08, 2.04, 2.01 (each s, each 3H, Ac); MS(Fab) Calcd for $C_{46}H_{77}N_5NaO_{33}[M + Na^+]$ 1250.4, found 1250.3

実施例 3 7 化合物40の合成

化合物17(1.5mg, 1.2 μ mol)を上記の操作で14時間反応させたところ、目的とする化合物40(1.1mg, 収率89%)で得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

1H -NMR (30°C)

δ 5.07 (d, 1H, $J = 9.5$ Hz, GlcNAc1-H-1), 4.91 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.76 (s, 1H, Man3-H-1), 4.62, 4.55 (each d, each 1H, GlcNAc2,5-H-1), 4.10, 4.07 (each s, each 1H, Man4',3-H-2), 2.89 (dd, 1H, $J = 3.7$ Hz, 17.0 Hz, Asn- β CH), 2.79 (dd, 1H, $J = 7.0$ Hz, 17.0 Hz, Asn- β CH), 2.07, 2.05, 2.01 (each s, each 3H, Ac); MS(Fab) Calcd for $C_{40}H_{67}N_5NaO_{28}[M + Na^+]$ 1088.4,

found 1088.2

実施例3 8 化合物41の合成

化合物18(1.3mg, 1.2 μ mol)を上記の操作で14時間反応させたところ、目的とする化合物41(0.8mg, 収率80%)で得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

$^1\text{H-NMR}$ (30°C)

δ 5.07 (d, 1H, J = 9.5 Hz, GlcNAc1-H-1), 4.91 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.76 (s, 1H, Man3-H-1), 4.62 (d, 1H, J = 7.8 Hz, GlcNAc2-H-1), 4.08 (d, 1H, J = 2.9 Hz, Man3-H-2), 2.92 (dd, 1H, J = 3.9 Hz, 17.3 Hz, Asn- β CH), 2.83 (dd, 1H, J = 7.0 Hz, 17.3 Hz, Asn- β CH), 2.07, 2.01 (each s, each 3H, Ac); MS(Fab) Calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{55}\text{N}_4\text{O}_{27}[\text{M}+\text{H}^+]$ 863.3, found 863.2

実施例3 9 化合物44の合成

化合物21(2.3mg, 1.6 μ mol)を上記の操作で7時間反応させたところ、目的とする化合物44(1.6mg, 収率84%)で得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

$^1\text{H-NMR}$ (30°C)

δ 5.11 (s, 1H, Man4-H-1), 5.06 (d, 1H, J = 9.8 Hz, GlcNAc1-H-1), 4.77 (s, 1H, Man3-H-1), 4.61, 4.57 (each d, each 1H, GlcNAc2, 5-H-1), 4.46 (d, 1H, J = 7.8 Hz, Gal-H-1), 4.22, 4.18 (each bs, each 1H, Man3, 4-H-2), 2.91 (dd, 1H, J = 4.1 Hz, 17.3 Hz, Asn- β CH), 2.82 (dd, 1H, J = 7.0 Hz, 17.3 Hz, Asn- β CH), 2.05, 2.04, 2.01 (each s, each 3H, Ac); MS(Fab) Calcd for $\text{C}_{46}\text{H}_{78}\text{N}_5\text{O}_{33}[\text{M}+\text{H}^+]$ 1228.5, found 1228.3

実施例4 0 化合物45の合成

化合物22(1.6mg, 1.3 μ mol)を上記の操作で14時間反応させたところ、目的とする化合物45(1.1mg, 収率85%)で得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

$^1\text{H-NMR}$ (30°C)

δ 5.12 (s, 1H, Man4-H-1), 5.07 (d, 1H, J = 9.7 Hz, GlcNAc1-H-1), 4.77 (s, 1H, Man3-H-1), 4.61, 4.54 (each d, each 1H, GlcNAc2, 5-H-1), 4.22 (d, 1H, J = 2.5 Hz, Man3-H-2), 4.18 (dd, 1H, J = 1.4 Hz, 3.0 Hz, Man4'-H-2), 2.89 (dd, 1H, J = 4.3 Hz, 16.9 Hz, Asn- β CH), 2.78 (dd, 1H, J = 7.5 Hz, 16.9 Hz, Asn- β CH), 2.06, 2.05, 2.01 (each s, each 3H, Ac); MS(Fab) Calcd for $\text{C}_{40}\text{H}_{67}\text{N}_5\text{NaO}_{23}[\text{M}+\text{Na}^+]$ 1088.4, found 1088.3.

実施例4 1 化合物46の合成

化合物23(1.6mg, 1.5 μ mol)を上記の操作で14時間反応させたところ、目的とする化合物46(1.1mg, 6.4 μ mol, 収率85%)で得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

$^1\text{H-NMR}$ (30°C)

δ 5.10 (s, 1H, Man4-H-1), 5.06 (d, 1H, J = 9.5 Hz, GlcNAc1-H-1), 4.77 (s, 1H, Man3-H-1), 4.61 (d, 1H, J = 7.3 Hz, GlcNAc2-H-1), 4.22 (d, 1H, J = 2.4 Hz, Man3-H-2), 4.07 (dd, 1H, J = 1.6 Hz, 3.0 Hz, Man4'-H-2), 2.90 (dd, 1H, J = 4.3 Hz, 17.0 Hz, Asn- β CH), 2.80 (dd, 1H, J = 7.0 Hz, 17.2 Hz, Asn- β CH), 2.05, 2.01 (each s, each 3H, Ac); MS(Fab) Calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{55}\text{N}_4\text{O}_{23}[\text{M}+\text{H}^+]$ 863.3, found 863.3

実施例4 2 化合物34の合成

化合物11(12.4mg, 7.5 μ mol)を上記の操作で11時間反応させたところ、目的とする化合物34(9.2mg, 収率86%)で得られた。得られた化合物の物理的データは

以下の通りである。

¹H-NMR (30°C)

δ 5.11 (s, 1H, Man4-H-1), 5.07 (d, 1H, J = 10.0 Hz, GlcNAc1-H-1), 4.91 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.77 (s, 1H, Man3-H-1), 4.61 (d, 1H, J = 6.8 Hz, GlcNAc2-H-1), 4.55 (d, 2H, GlcNAc5, 5'-H-1), 4.24 (bs, 1H, Man3-H-2), 4.18 (bs, 1H, Man4'-H-2), 4.10 (bs, 1H, Man4-H-2), 2.80 (dd, 1H, J = 3.8 Hz, 15.6 Hz, Asn- β CH), 2.63 (dd, 1H, J = 8.2 Hz, 15.6 Hz, Asn- β CH), 2.07 (s, 3H, Ac), 2.05 (s, 6H, Ac \times 2), 2.01 (s, 3H, Ac); MS(Fab) Calcd for $C_{54}H_{90}N_6NaO_{38}[M+Na^+]$ 1453.5, found 1453.2

実施例4 3 化合物35の合成

化合物12(12.0mg, 8.4 μ mol)を上記の操作で11時間反応させたところ、目的とする化合物35(7.0mg, 収率81%)で得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

¹H-NMR (30°C)

δ 5.10 (s, 1H, Man4-H-1), 5.07 (d, 1H, J = 9.7 Hz, GlcNAc1-H-1), 4.91 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.78 (s, 1H, Man3-H-1), 4.61 (d, 1H, J = 8.0 Hz, GlcNAc2-H-1), 4.25 (bs, 1H, Man3-H-2), 4.06 (bs, 1H, Man4'-H-2), 3.97 (bs, 1H, Man4-H-2), 2.79 (dd, 1H, J = 5.0 Hz, 17.0 Hz, Asn- β CH), 2.61 (dd, 1H, J = 7.3 Hz, 17.0 Hz, Asn- β CH), 2.07, 2.01 (each s, each 3H, Ac); MS(Fab) Calcd for $C_{38}H_{65}N_4O_{28}[M+H^+]$ 1025.4, found 1025.2

実施例4 4 化合物76、77の合成および単離

化合物2、6(5.0mg, 2.2 μ mol)を220 μ Lの水に溶解させ、22mMの炭酸セシウム水溶液を100 μ L加え、pH7.0とした。この溶液を凍結乾燥した。乾燥後の固体物にN,N-ジメチルホルムアミドを430 μ L加え、更に6.6 μ molのベンジルプロマイド

／N,N-ジメチルホルムアミド溶液を20 μ L加えた。この溶液をアルゴン雰囲気下で攪拌した。48時間後、TLC（展開溶媒は1M NH₄OAc：イソプロパノール=2：1を用いた）にて原料の消失を確認した後、4.4mLのジエチルエーテルを加えて化合物を沈殿させた。沈殿した糖鎖を濾過し、残った糖鎖を水に溶解させ凍結乾燥した。凍結乾燥後の残留物を分取HPLC(YMC Packed Column D-ODS-5 S-5 120A ODS No. 2020178、20×250mm、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル=78：22、流速4.0mL/min)で精製したところ、88分後に化合物77が、91分後に化合物76が溶出した。それぞれを取り分け、更にODSカラム(コスモシール75C₁₈-OPN、15×100mm、最初にH₂Oを50mL流し、次に25%アセトニトリルを流して溶出させた)で脱塩したところ、目的とする化合物76が1.6mg、化合物77が1.8mg得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

化合物76のデータ

¹H-NMR (30°C)

δ 7.92 (d, 2H, J = 7.5 Hz, Fmoc), 7.71 (d, 2H, J = 7.5 Hz, Fmoc), 7.53-7.40 (m, 9H, Fmoc, -CH₂-Ph), 5.38 (d, 1H, J = 12.1 Hz, -CH₂-Ph), 5.31 (d, 1H, J = 12.1 Hz, -CH₂-Ph), 5.12 (s, 1H, Man4-H-1), 4.99 (d, 1H, J = 9.5 Hz, GlcNAc1-H-1), 4.92 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.76 (s, 1H, Man3-H-1), 4.58 (m, 3H, GlcNAc2, 5, 5'-H-1), 4.47 (d, 1H, J = 7.9 Hz, Gal6'-H-1), 4.33 (d, 1H, J = 7.9 Hz, Gal6-H-1), 4.24 (bs, 1H, Man3-H-2), 4.19 (bs, 1H, Man4'-H-2), 4.11 (bs, 1H, Man4-H-2), 2.72 (bd, 1H, Asn- β CH), 2.68 (dd, 1H, J = 4.6 Hz, 12.7 Hz, NeuAc7-H-3_{eq}), 2.52 (dd, 1H, J = 8.7 Hz, 15.0 Hz, Asn- β CH), 2.07, 2.04, 2.03, 2.02, 1.89 (each s, each 3H, Ac) 1.84 (dd, 1H, J = 12.7 Hz, 12.7 Hz, NeuAc7-H3_{ax})； MS(Fab) Calcd for C₉₉H₁₄₃N₁₇NaO₅₈[M + H⁺] 2380.8, found 2380.0.

化合物77のデータ

¹H-NMR (30°C)

δ 7.91 (d, 2H, J = 7.5 Hz, Fmoc), 7.71 (d, 2H, J = 7.5 Hz, Fmoc), 7.53-7.41 (m, 9H, Fmoc, -CH₂-Ph), 5.37 (d, 1H, J = 12.1 Hz, -CH₂-Ph), 5.31 (d, 1H, J = 12.1 Hz, -CH₂-Ph), 5.12 (s, 1H, Man4-H-1), 4.99 (d, 1H, J = 9.8 Hz, GlcNAc1-H-1), 4.93 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.76 (s, 1H, Man3-H-1), 4.58 (m, 3H, GlcNAc2, 5, 5'-H-1), 4.46 (1H, d, J = 7.8 Hz, Gal6-H-1), 4.33 (d, 1H, J = 7.8 Hz, Gal6'-H-1), 4.24 (bs, 1H, Man3-H-2), 4.19 (bs, 1H, Man4'-H-2), 4.11 (bs, 1H, Man4-H-2), 2.72 (bd, 1H, Asn- β CH), 2.68 (dd, 1H, J = 4.8 Hz, 13.0 Hz, NeuAc7-H-3_{eq}), 2.52 (bdd, 1H, J = 9.7 Hz, 14.1 Hz, Asn- β CH), 2.06, 2.05, 2.04, 2.02, 1.89 (each s, each 3H, Ac), 1.84 (dd, 1H, J = 13.0 Hz, 13.0 Hz, NeuAc7-H-3_{ax}); MS(Fab) Calcd for C₉₉H₁₄₃N₇NaO₅₈[M+H⁺] 2380.8, found 2380.5

実施例4 5 化合物78の合成

4°Cに冷やしたDowex-50Wx8(H⁺)のカラム(Φ0.5 cm x 5 cm)に化合物1(20mg)の冷水溶液を流し、溶出した水溶液を凍結乾燥した。得られた凍結乾燥物を4°Cの冷水に溶かし、これにCs₂CO₃水溶液(2.5mg/1ml)を加え水溶液のpHが5~6になるよう調整し、その後、該水溶液を凍結乾燥した。凍結乾燥後のFmoc-ジシアロ糖鎖試料をDryDMF(1.3ml)に溶かし、ベンジルプロミド(5.1μl)を加えてアルゴン気流下室温で45時間攪拌した。TLCで反応終了を確認後、反応溶液を0°Cに冷やしジエチルエーテル10mlを加え目的物を析出させた。これをろ紙でろ過した。残った目的物に蒸留水を加えろ液として溶出させ、続いてこれを減圧濃縮した。得られた残渣をODSカラム(Φ 1.6cm x 14cm, 溶出液: H₂O → 40% MeOH水溶液)にかけ精製し化合物78(18.2mg, 収率85%)を得た。得られた化合物78の物理的データは以下の通りである。

¹H-NMR (30°C)

7.90 (d, 2H, Fmoc), 7.70 (d, 2H, Fmoc), 7.53-7.40 (m, 9H, Bn, Fmoc), 5.3

6 (d, 2H, $J = 11.6$ Hz, CH_2), 5.30 (d, 2H, $J = 11.6$ Hz, CH_2), 5.12 (s, 1H, Man4- H_1), 4.99 (d, 1H, $J = 9.7$ Hz, GlcNAc1- H_1), 4.93 (s, 1H, Man4'- H_1), 4.75 (s, 1H, Man3- H_1), 4.57 (m, 3H, GlcNAc2- H_1 , GlcNAc5, 5'- H_1), 4.32 (d, 2H, Gal6, 6'- H_1), 4.24 (d, 1H, Man3- H_2), 4.18 (d, 1H, Man4'- H_2), 4.10 (1H, d, Man4- H_2), 2.72 (bd, 1H, Asn- β CH), 2.67 (dd, 2H, NeuAc7, 7'- $\text{H}_{3\text{eq}}$), 2.51 (bdd, 1H, Asn- β CH), 2.06 (s, 3H, Ac), 2.03, 2.01 (each s, each 6H, Ac x 2), 1.89 (s, 3H, Ac), 1.83 (2H, dd, $J = 12.2, 12.2$ Hz, NeuAc7, 7'- $\text{H}_{3\text{ax}}$) ; HRMS Calcd for $\text{C}_{117}\text{H}_{165}\text{N}_8\text{Na}_2\text{O}_{66}[\text{M}+\text{Na}^+]$ 2783.9597, found 2783.9501

産業上の利用可能性

本発明によれば、所望の糖鎖構造を有する、様々な糖鎖類を非常に容易かつ大量に得ることができる。従って、癌、炎症、インフルエンザなどの治療薬への利用が期待される。特に、本発明により得られ得る糖鎖アスパラギン誘導体、糖鎖アスパラギンは製造工程における毒性成分の混入等の危険性はなく安全性に優れたものである。

請求の範囲

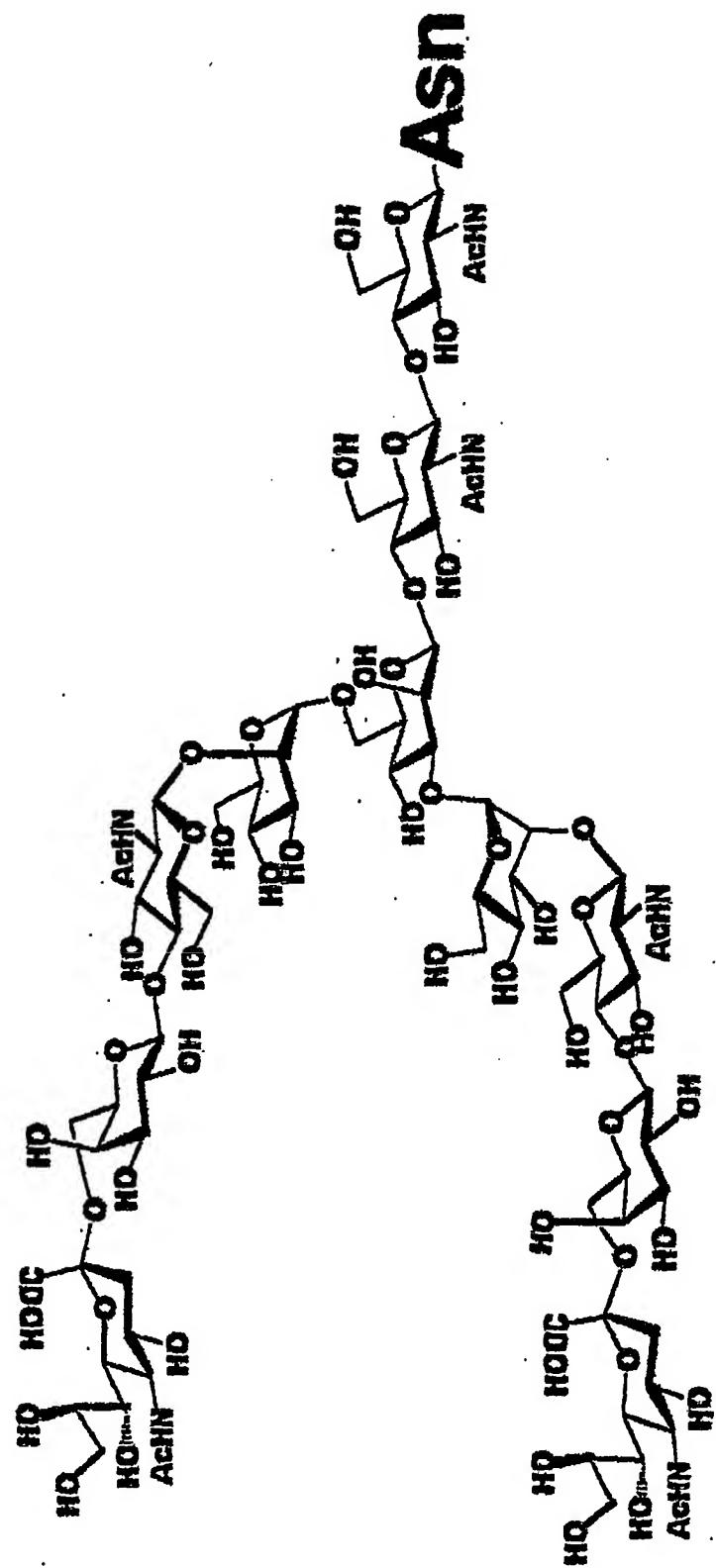
1. (a) 1種もしくは2種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物に含まれる該糖鎖アスパラギンに脂溶性の保護基を導入して糖鎖アスパラギン誘導体混合物を得る工程、

ならびに

(b) 該糖鎖アスパラギン誘導体混合物または該糖鎖アスパラギン誘導体混合物に含まれる糖鎖アスパラギン誘導体を加水分解して得られる混合物をクロマトグラフィーに供して各糖鎖アスパラギン誘導体を分離する工程、
を含む、糖鎖アスパラギン由来の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法。

2. (b') 工程 (b) で分離された糖鎖アスパラギン誘導体を糖加水分解酵素を用いて加水分解する工程をさらに含む請求項 1 記載の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法。

3. 1種もしくは2種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物が、



および／または該化合物において1以上の糖残基が欠失した化合物を含むものである、請求項1または2記載の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法。

4. 脂溶性の保護基がフルオレニルメトキシカルボニル(Fmoc)基である

請求項 1～3 いずれか記載の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法。

5. 工程 (a) が、非還元末端にシアル酸残基を有する 1 種もしくは 2 種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物に含まれる該糖鎖アスパラギンに Fmoc 基を導入し、かつシアル酸残基にベンジル基を導入して糖鎖アスパラギン誘導体混合物を得る工程である、請求項 1～3 いずれか記載の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法。

6. (a) 1 種もしくは 2 種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物に含まれる該糖鎖アスパラギンに脂溶性の保護基を導入して糖鎖アスパラギン誘導体混合物を得る工程、

(b) 該糖鎖アスパラギン誘導体混合物または該糖鎖アスパラギン誘導体混合物に含まれる糖鎖アスパラギン誘導体を加水分解して得られる混合物をクロマトグラフィーに供して各糖鎖アスパラギン誘導体を分離する工程、ならびに

(c) 工程 (b) で分離された糖鎖アスパラギン誘導体の保護基を除去して糖鎖アスパラギンを得る工程、

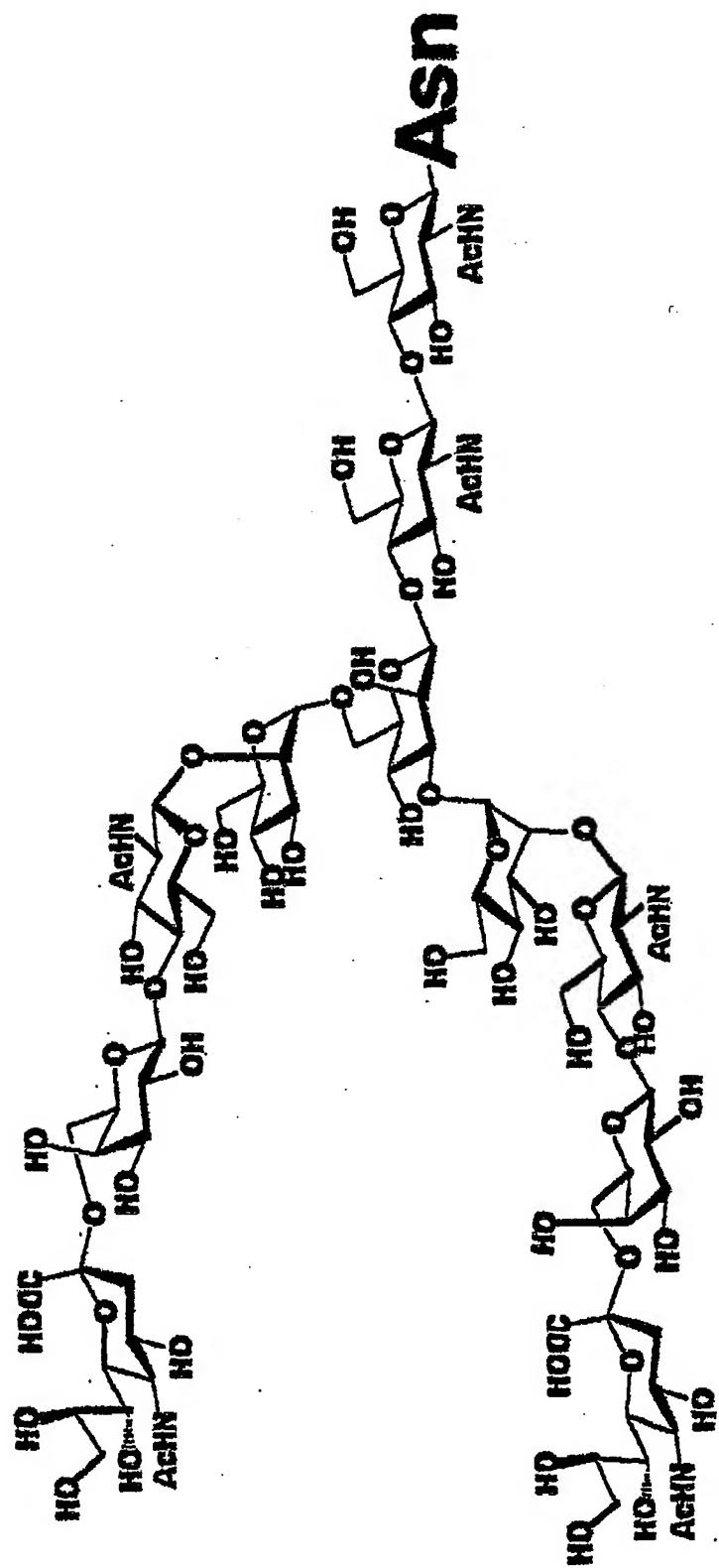
を含む、糖鎖アスパラギンの製造方法。

7. (b') 工程 (b) で分離された糖鎖アスパラギン誘導体を糖加水分解酵素を用いて加水分解する工程、および／または

(c') 工程 (c) で得られた糖鎖アスパラギンを糖加水分解酵素を用いて加水分解する工程、

をさらに含む、請求項 6 記載の糖鎖アスパラギンの製造方法。

8. 1 種もしくは 2 種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物が、



および／または該化合物において1以上の糖残基が欠失した化合物を含むものである、請求項6または7記載の糖鎖アスパラギンの製造方法。

9. 脂溶性の保護基がFmoc基である請求項6～8いずれか記載の糖鎖アスパラギンの製造方法。

10. 工程(a)が、非還元末端にシアル酸残基を有する1種もしくは2種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物に含まれる該糖鎖アスパラギンにFmoc基を導入し、かつシアル酸残基にベンジル基を導入して糖鎖アスパラギン誘導体混合物を得る工程である、請求項6～8いずれか記載の糖鎖アスパラギンの製造方法。

11. (a) 1種もしくは2種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物に含まれる該糖鎖アスパラギンに脂溶性の保護基を導入して糖鎖アスパラギン誘導体混合物を得る工程、

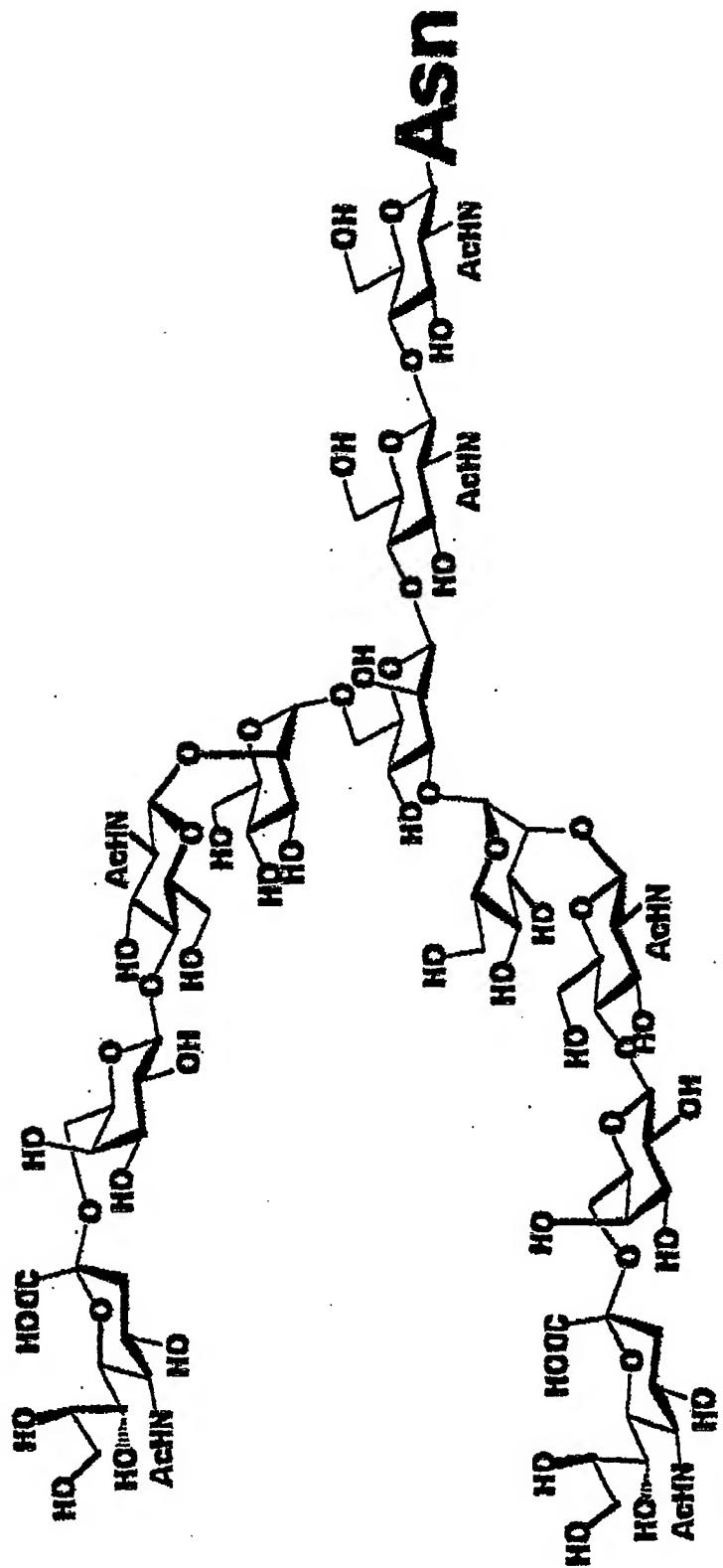
(b) 該糖鎖アスパラギン誘導体混合物または該糖鎖アスパラギン誘導体混合物に含まれる糖鎖アスパラギン誘導体を加水分解して得られる混合物をクロマトグラフィーに供して各糖鎖アスパラギン誘導体を分離する工程、

(c) 工程(b)で分離された糖鎖アスパラギン誘導体の保護基を除去して糖鎖アスパラギンを得る工程、ならびに

(d) 工程 (c) で得られた糖鎖アスパラギンのアスパラギン残基を除去して糖鎖を得る工程、
を含む、糖鎖の製造方法。

12. (b') 工程 (b) で分離された糖鎖アスパラギン誘導体を糖加水分解酵素を用いて加水分解する工程、および／または
(c') 工程 (c) で得られた糖鎖アスパラギンを糖加水分解酵素を用いて加水分解する工程、および／または
(d') 工程 (d) で得られた糖鎖を糖加水分解酵素を用いて加水分解する工程
をさらに含む、請求項 11 記載の糖鎖の製造方法。

13. 1種もしくは2種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物が、



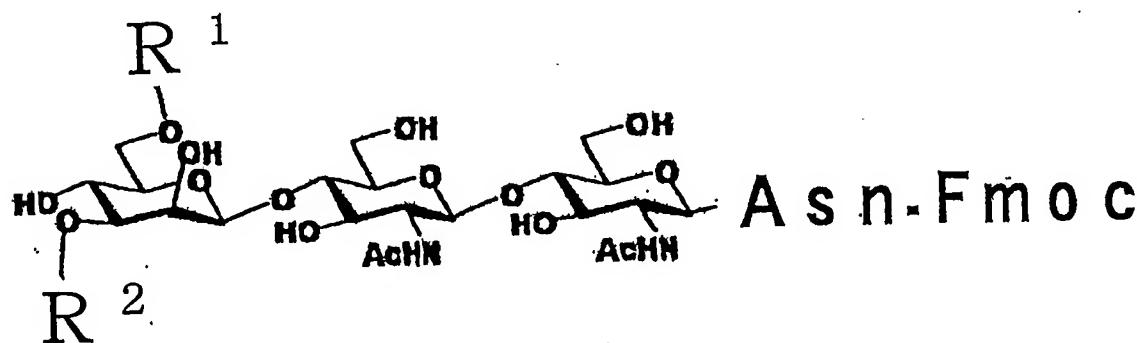
および／または該化合物において1以上の糖残基が欠失した化合物を含むものである、請求項11または12記載の糖鎖の製造方法。

14. 脂溶性の保護基がFmoc基である請求項11～13いずれか記載の糖鎖の製造方法。

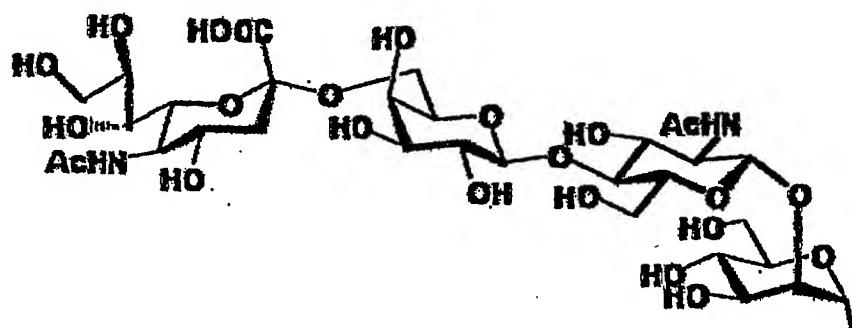
15. 工程(a)が、非還元末端にシアル酸残基を有する1種もしくは2種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物に含まれる該糖鎖アスパラギンにFmoc基

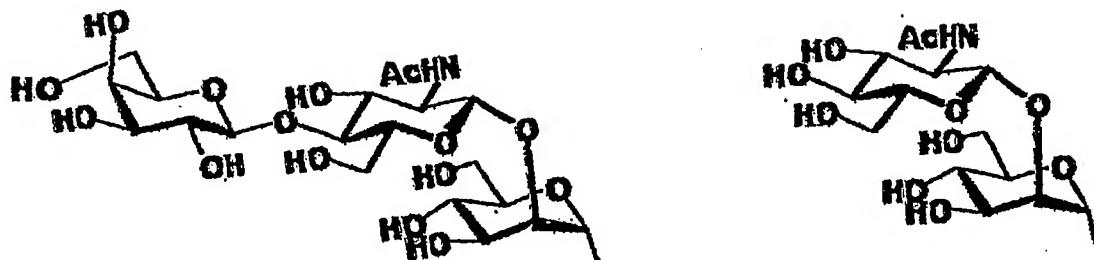
を導入し、かつシアル酸残基にベンジル基を導入して糖鎖アスパラギン誘導体混合物を得る工程である、請求項11～13いずれか記載の糖鎖の製造方法。

16. 一般式：



(式中、R¹ およびR² は、H、

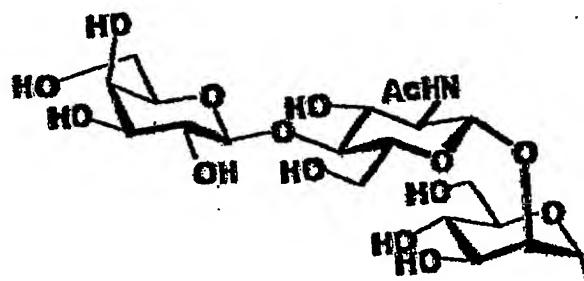




または

であり、同一でも異なっていてもよい。ただし、

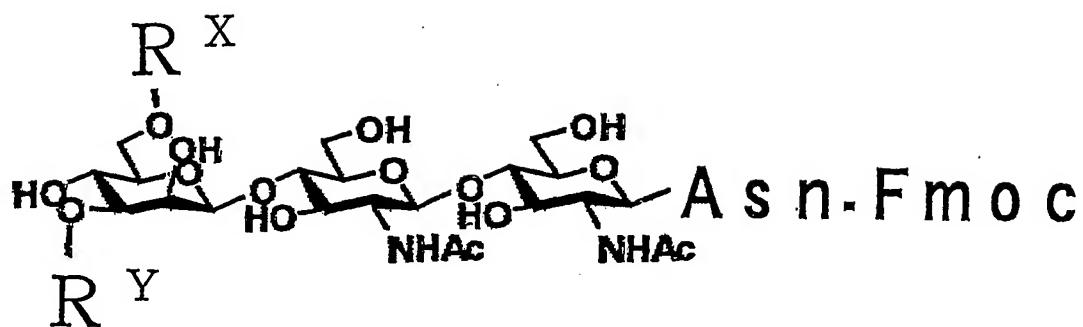
R^1 および R^2 が共に



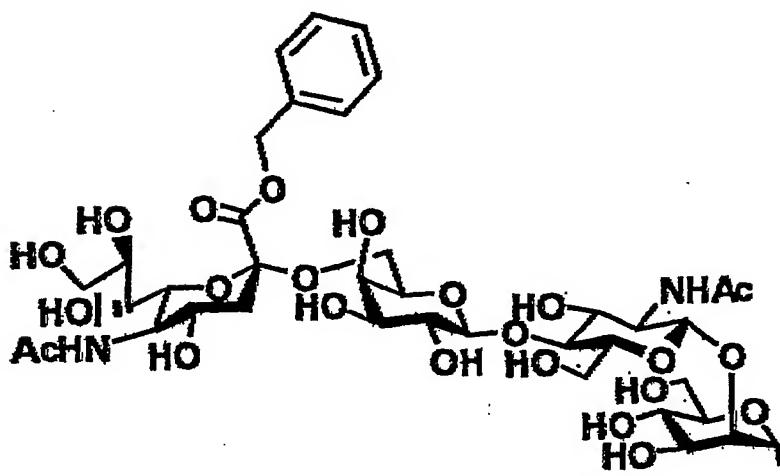
である場合を除く。)

を有する糖鎖アスパラギン誘導体。

17. 一般式：

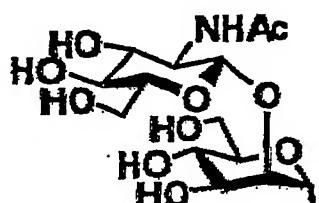
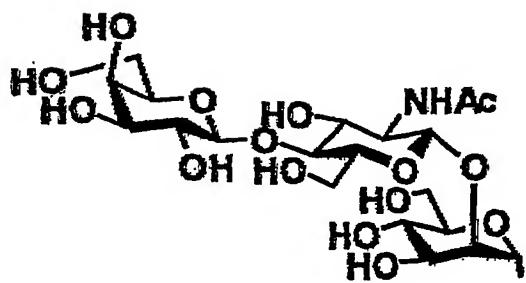
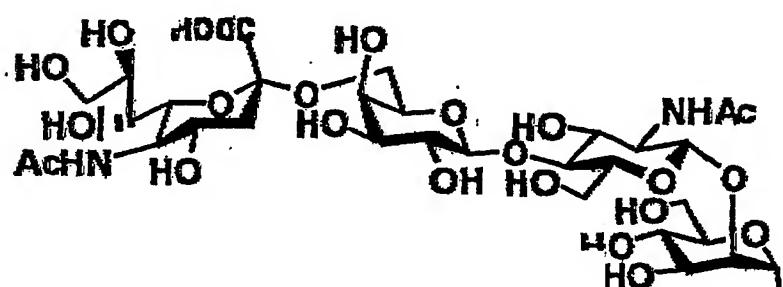
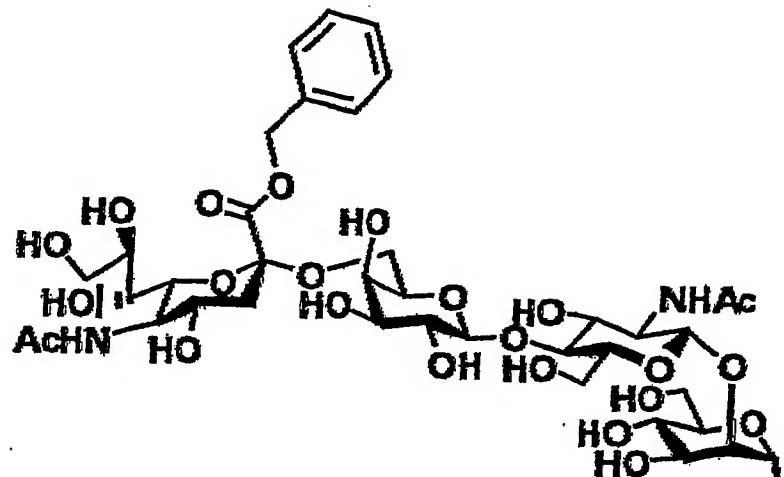


(式中、R^X およびR^Y は、一方が



であり、

他方が、H、



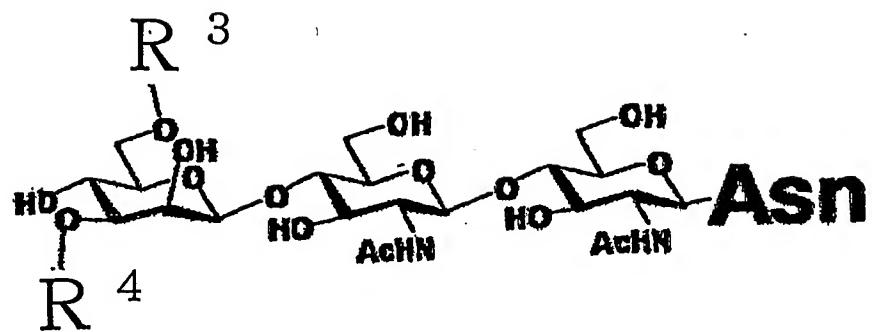
または



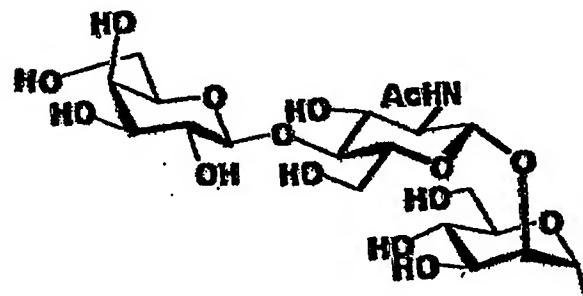
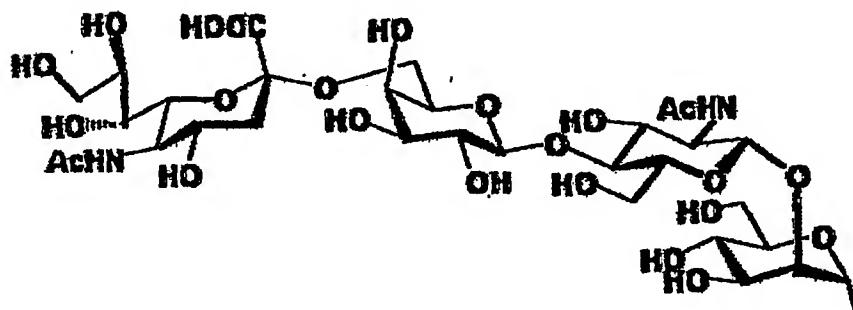
である。)

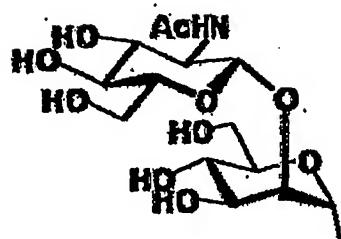
を有する糖鎖アスパラギン誘導体。

18. 一般式：

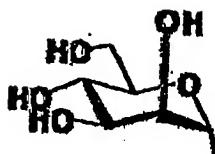


(式中、 R^3 および R^4 は、H、



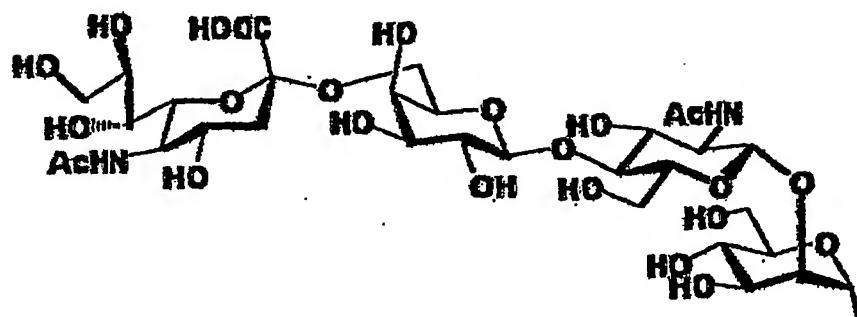


、または

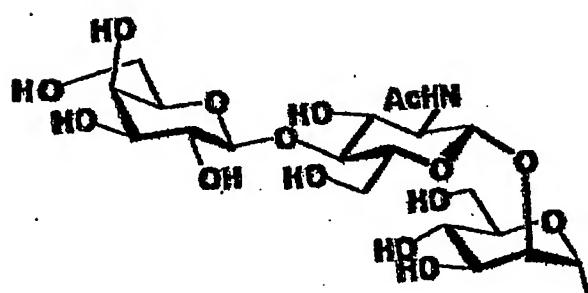


であり、

同一でも異なっていてもよい。ただし、R³ および R⁴ が共に



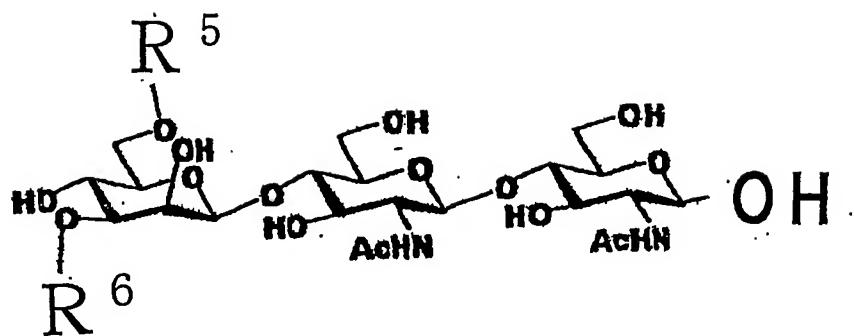
または



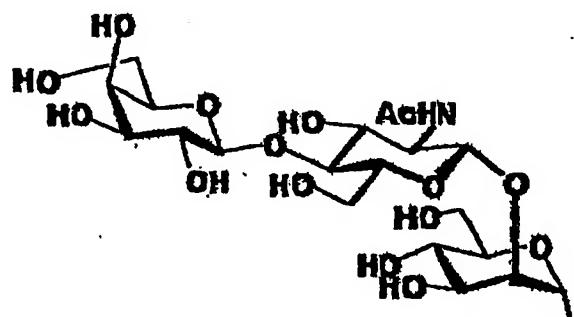
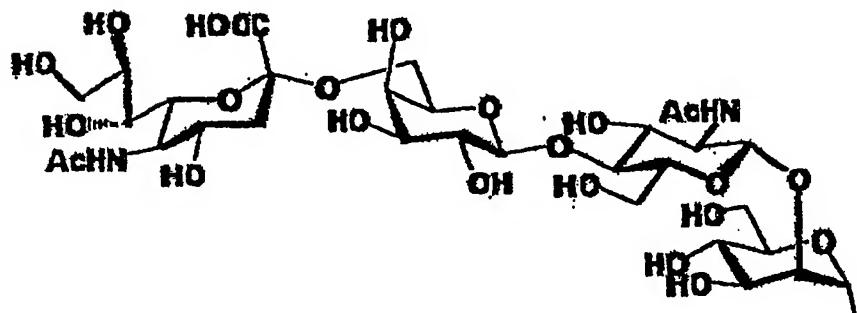
である場合を除く。)

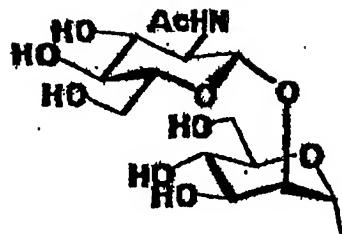
を有する糖鎖アスパラギン。

19. 一般式：

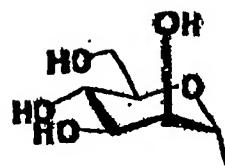


(式中、 R^5 および R^6 は、H、



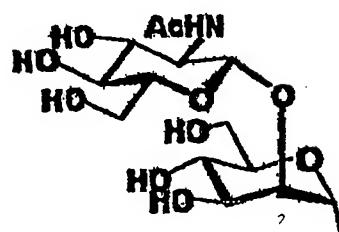
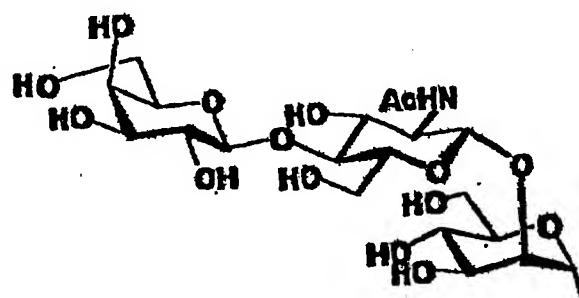
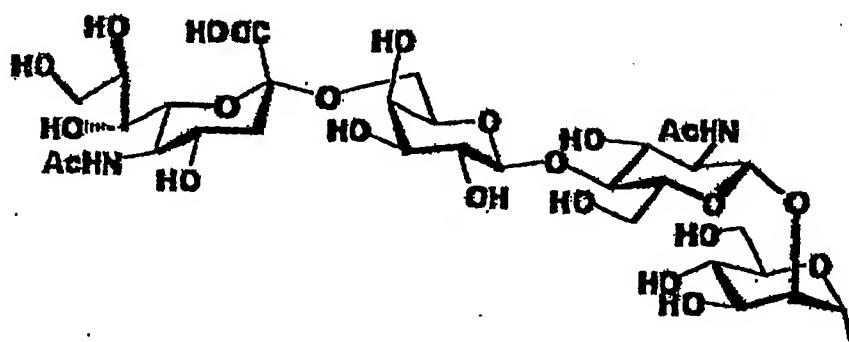


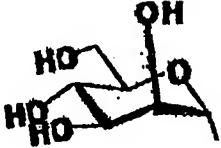
または

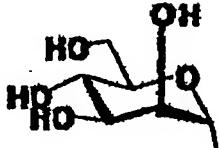


であり、

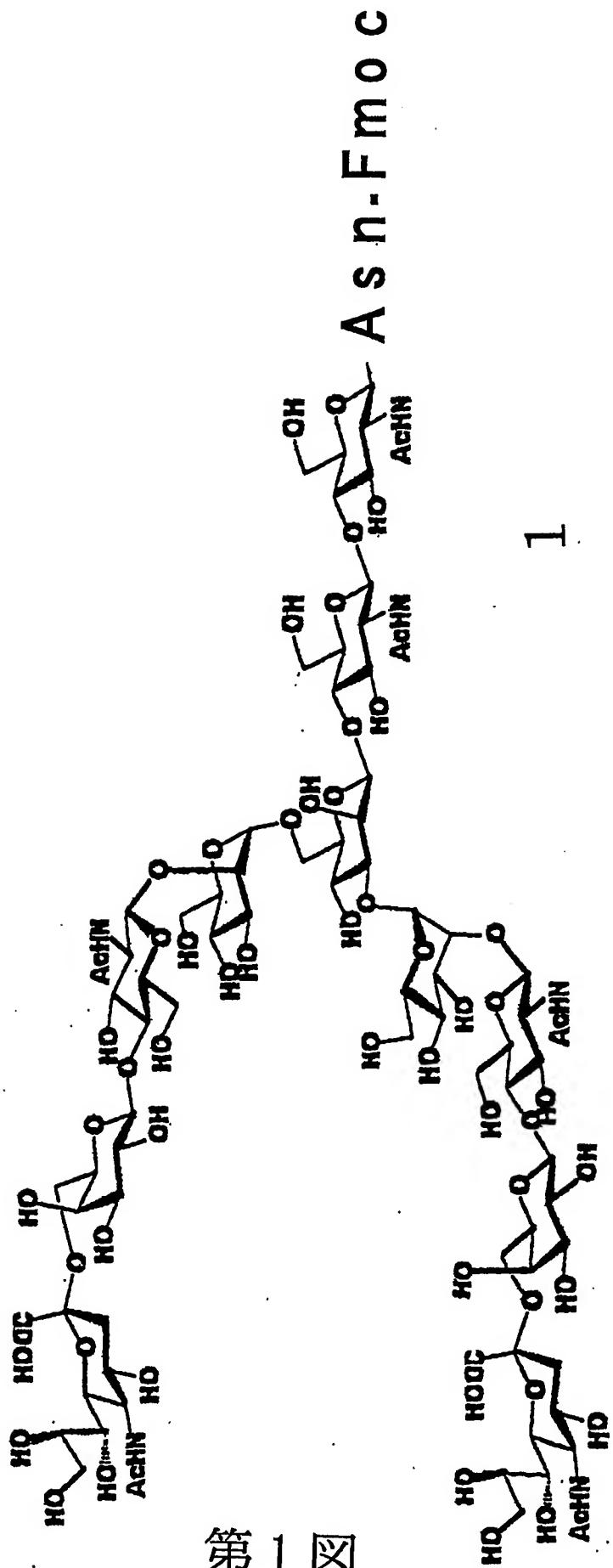
同一でも異なっていてもよい。ただし、R⁵ および R⁶ が共に



または  であるか、あるいは R^5 または R^6 の一方が H であり、

かつ他方が  である場合を除く。)

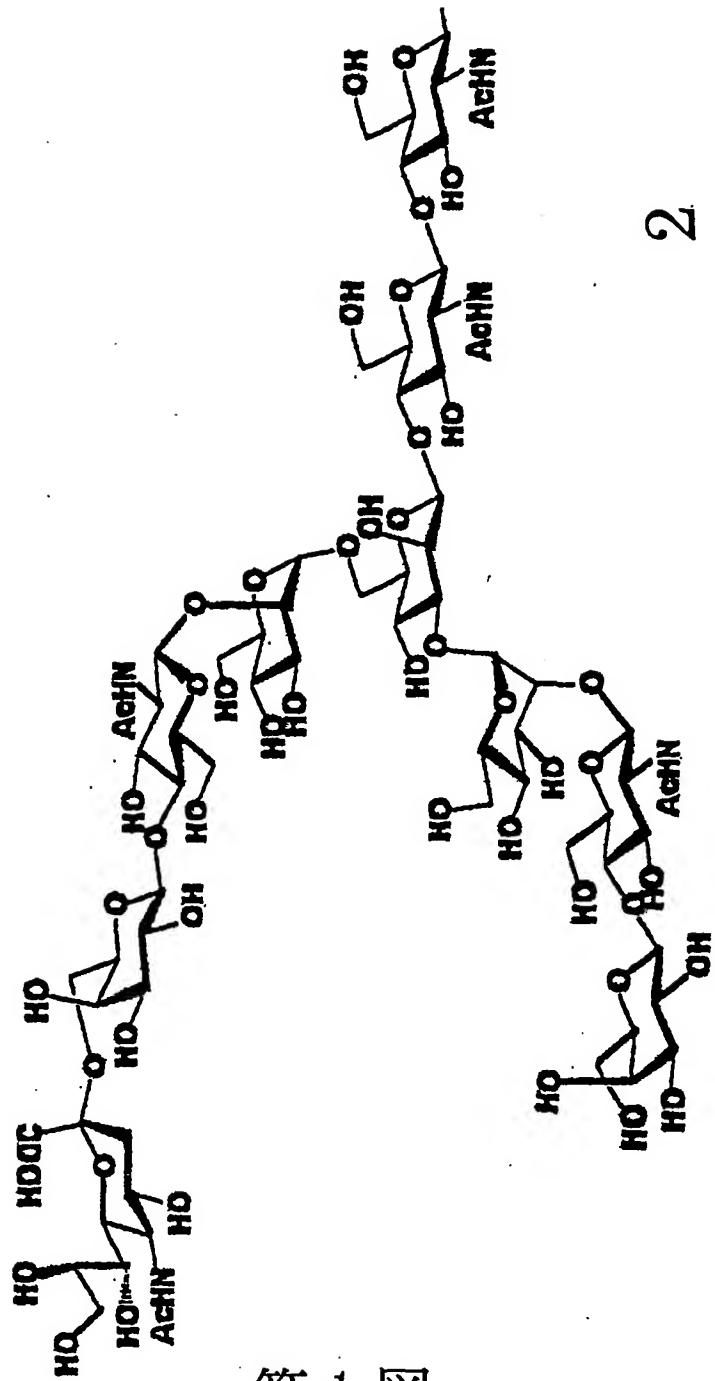
を有する糖鎖。



第1図

A s n - F m o c

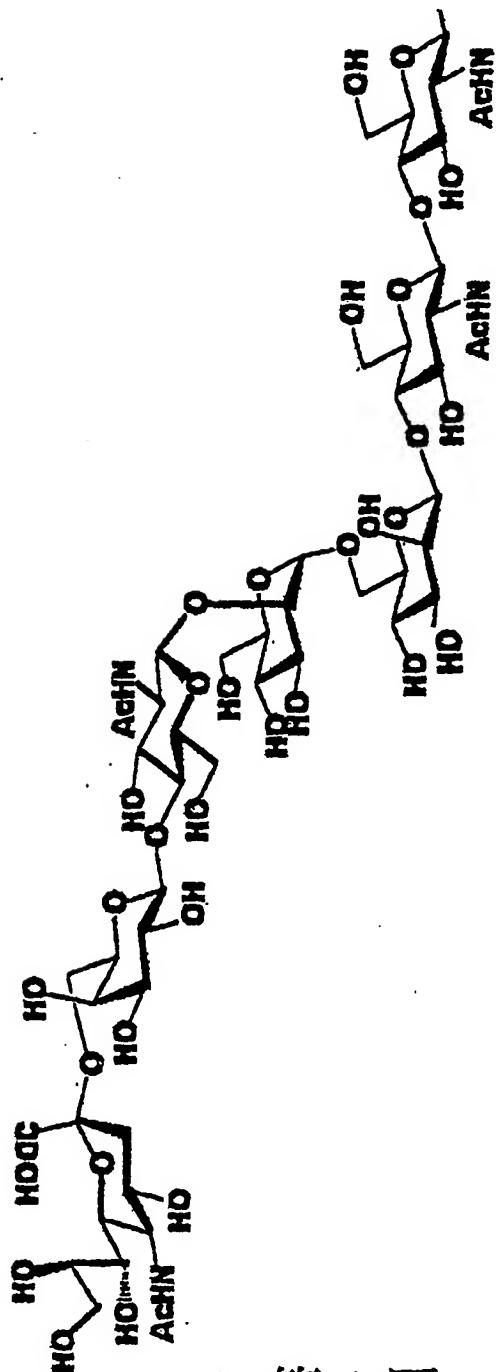
2



第 1 図

1/1/12

A S n-F m o C



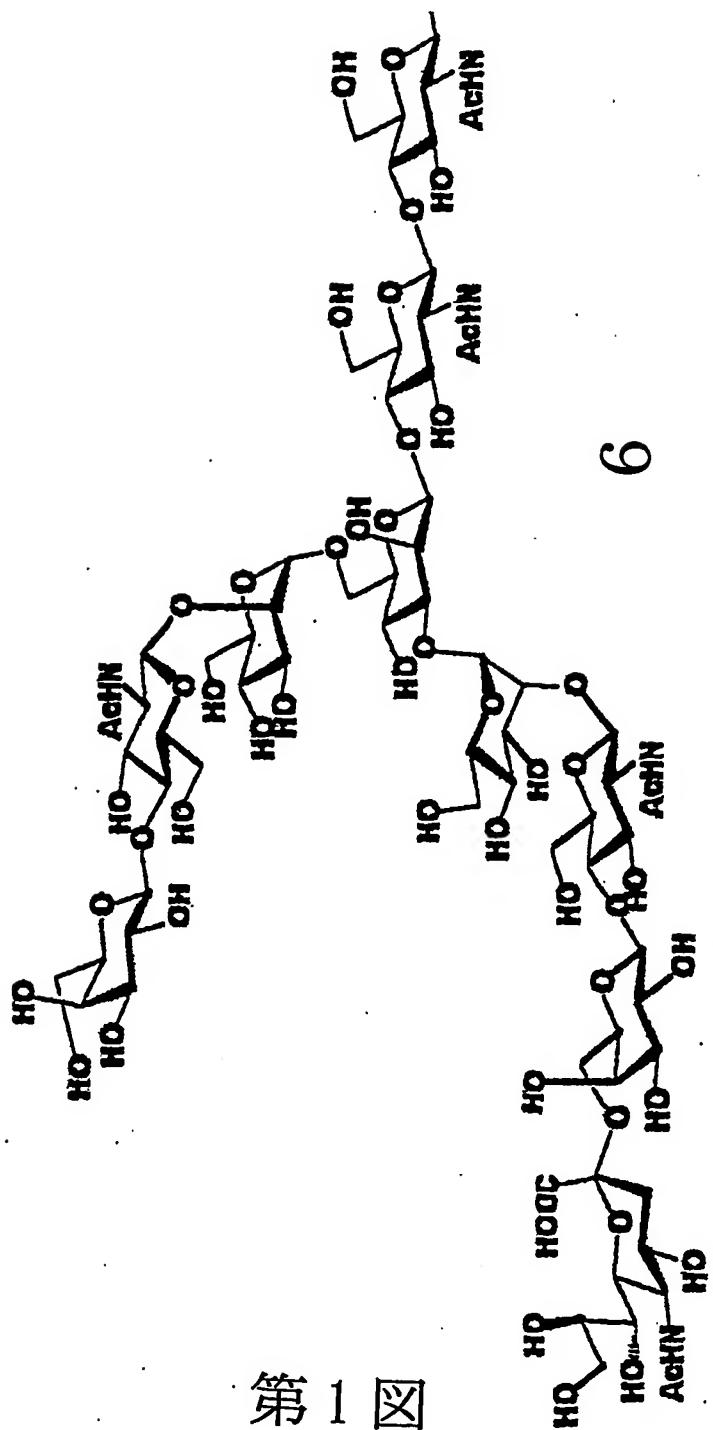
5

第1図

1/2/12

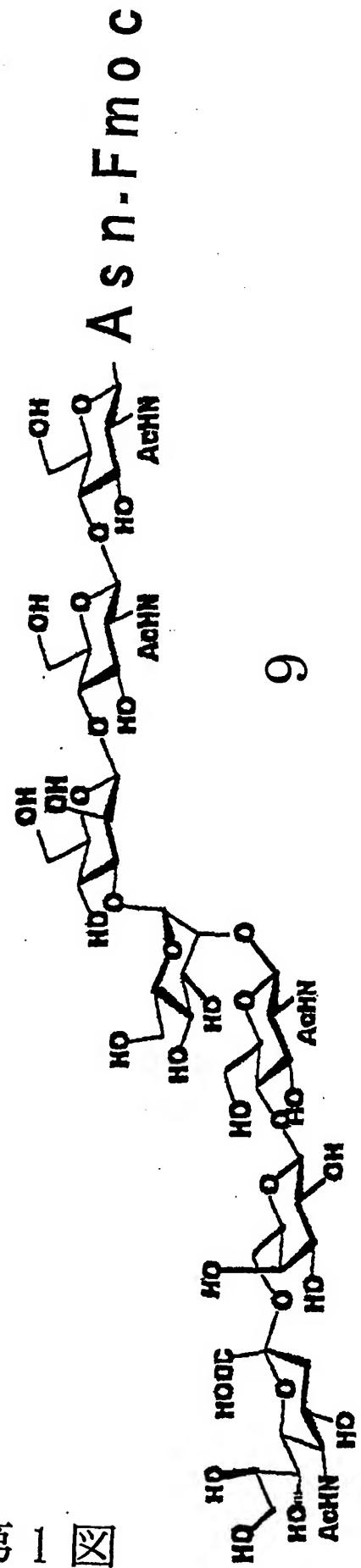
差替え用紙(規則26)

Asn-Fmoc



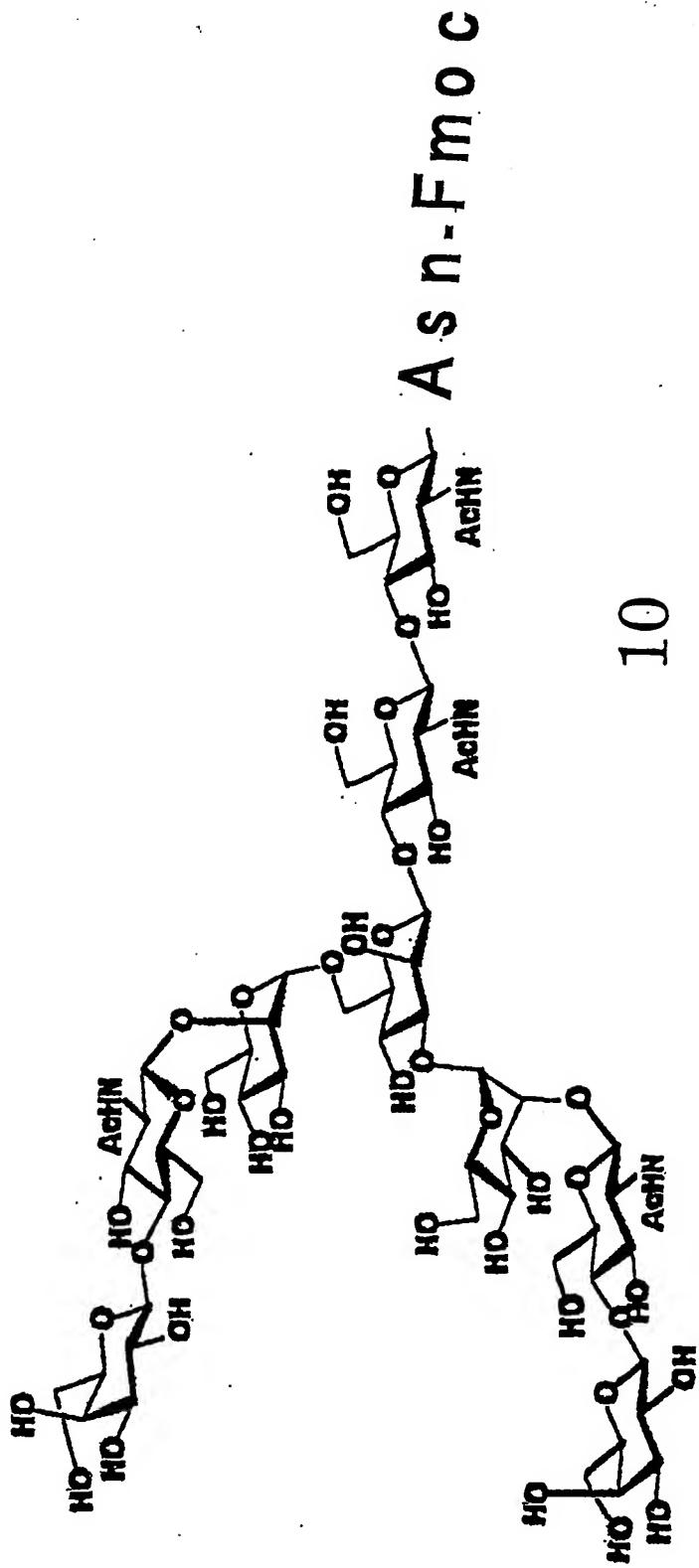
第1回

1/3/12



第1図

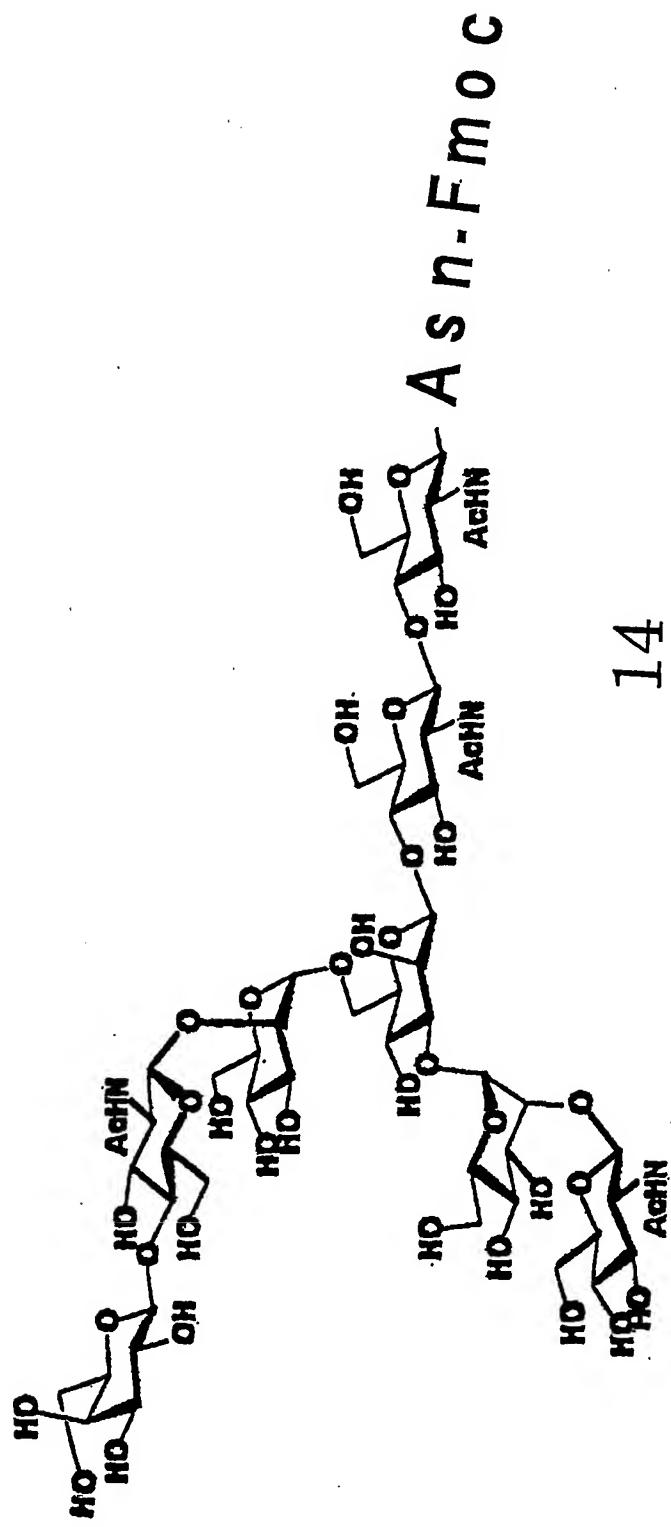
1/4/12



第1図

1/5/12

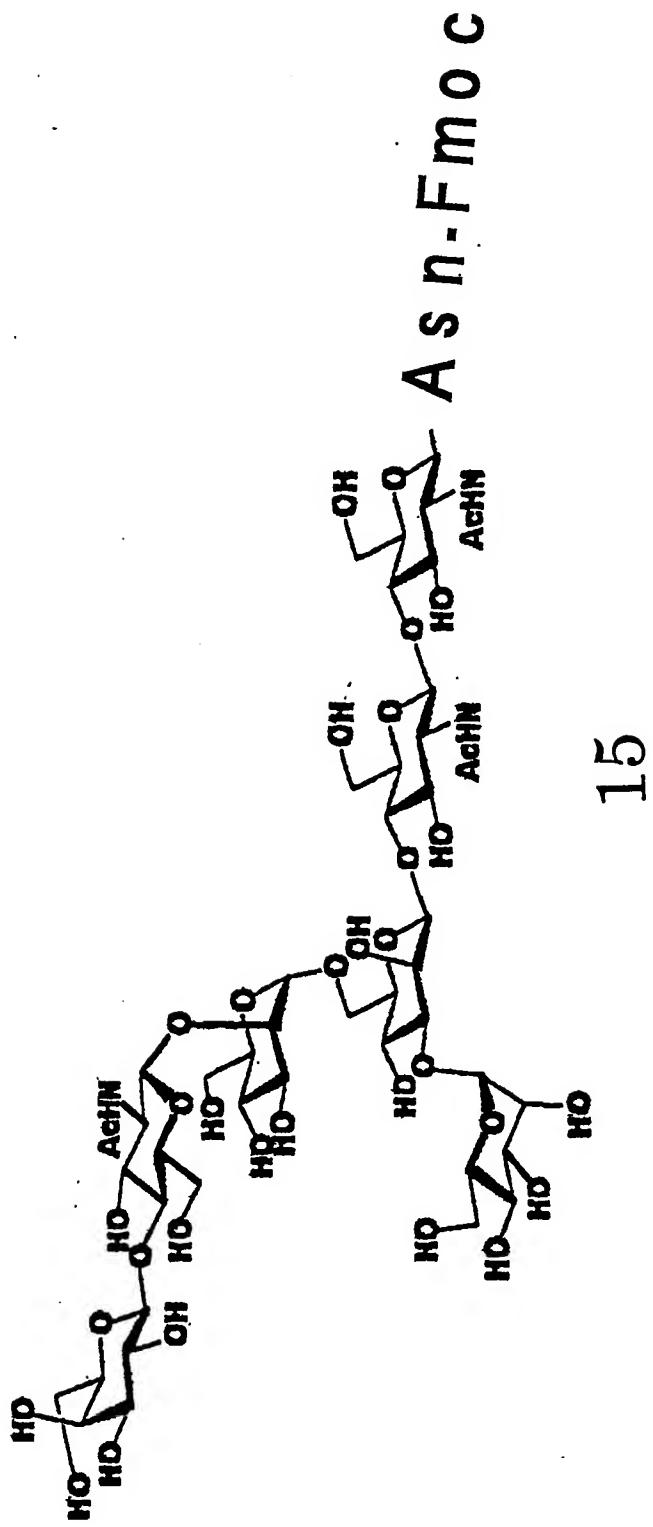
差替え用紙(規則26)



第1図

1/6/12

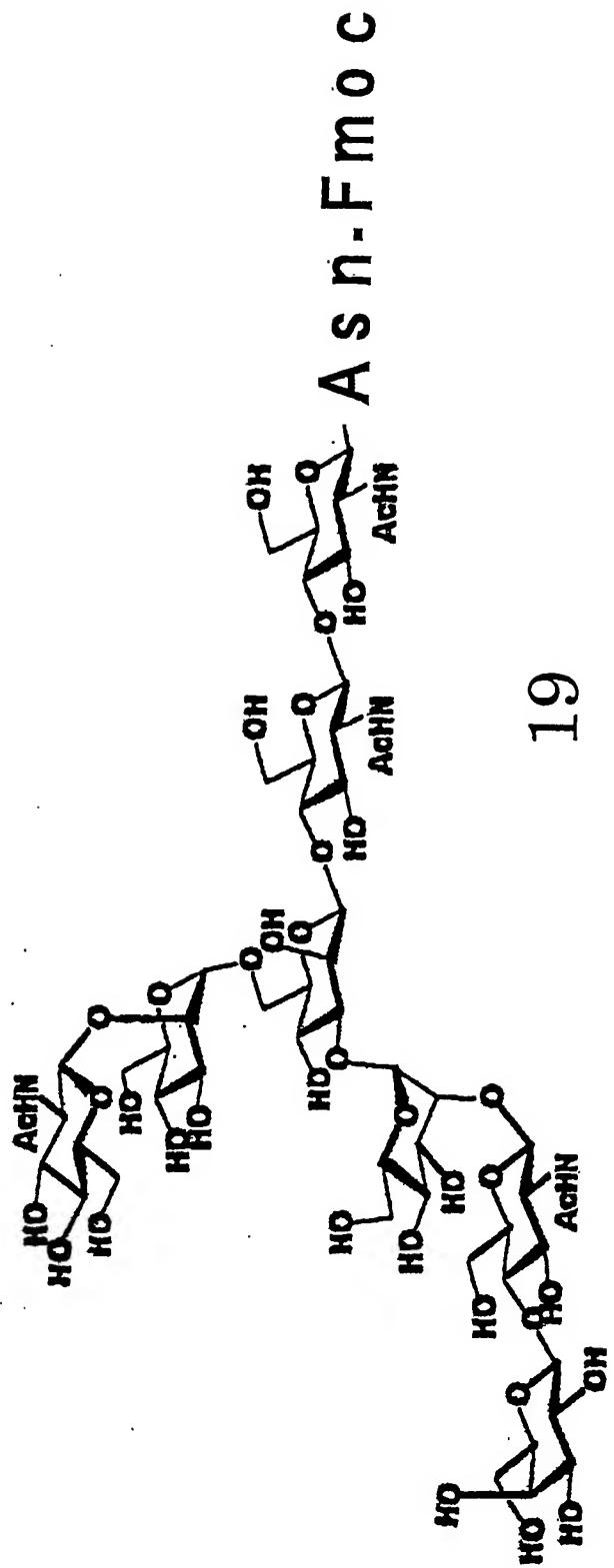
差替え用紙(規則26)



第 1 図

1/7/12

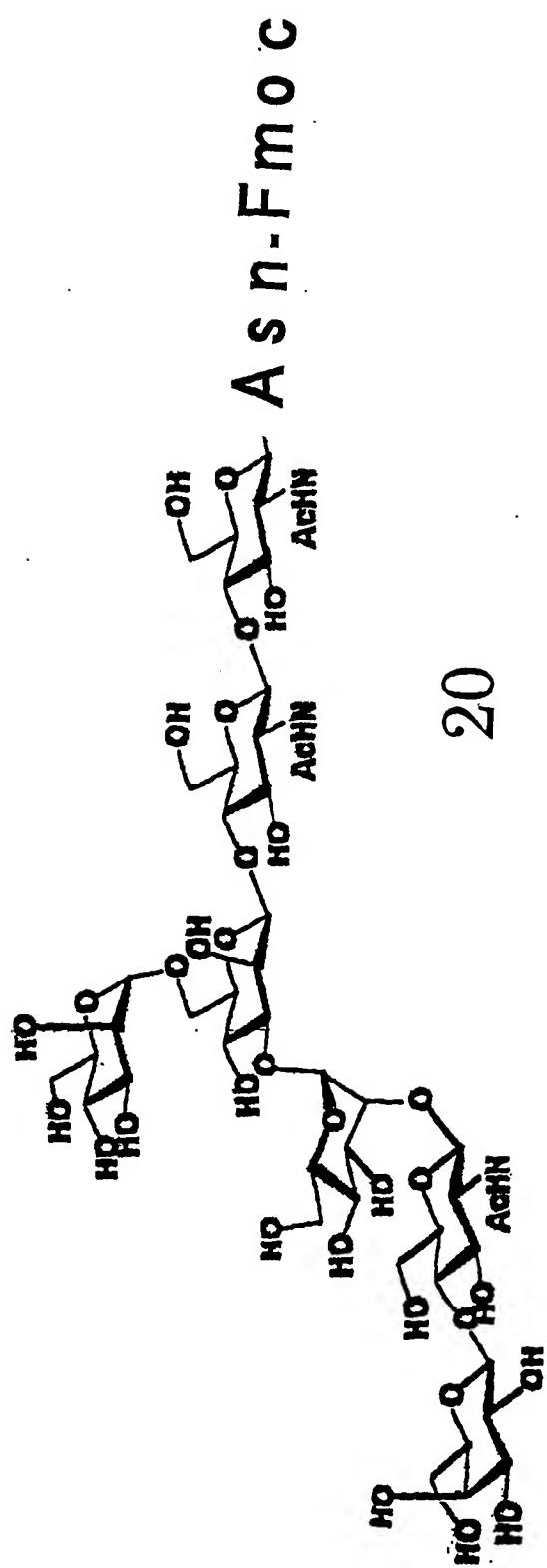
差替え用紙(規則26)



第1図

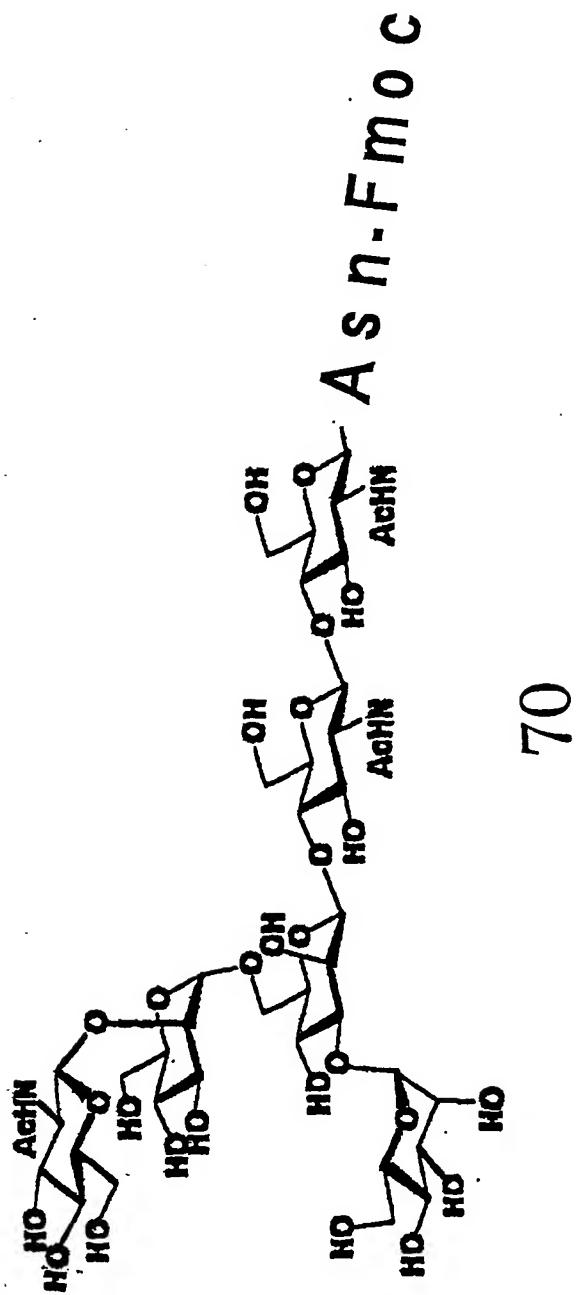
1/8/12

差特文用紙(規則126)



第1図

1/9/12

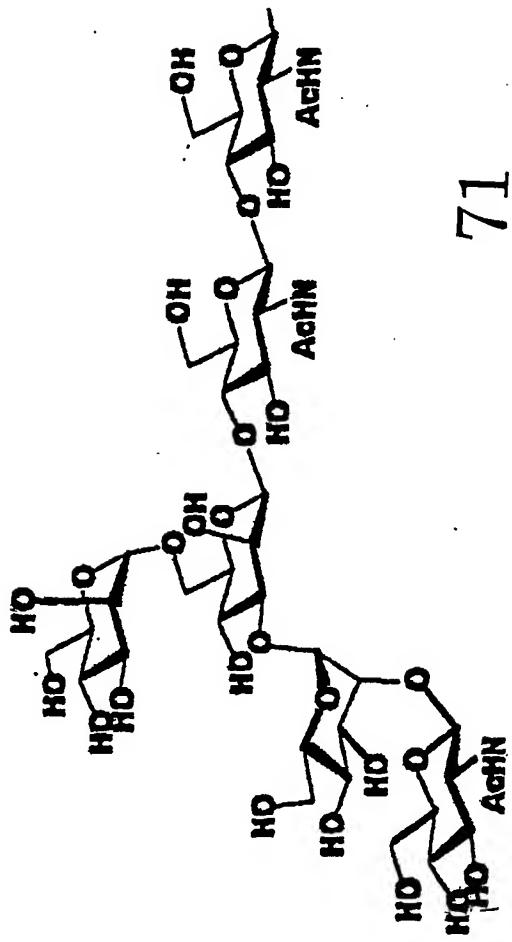


第1図

1/10/12

A S n - F m o c

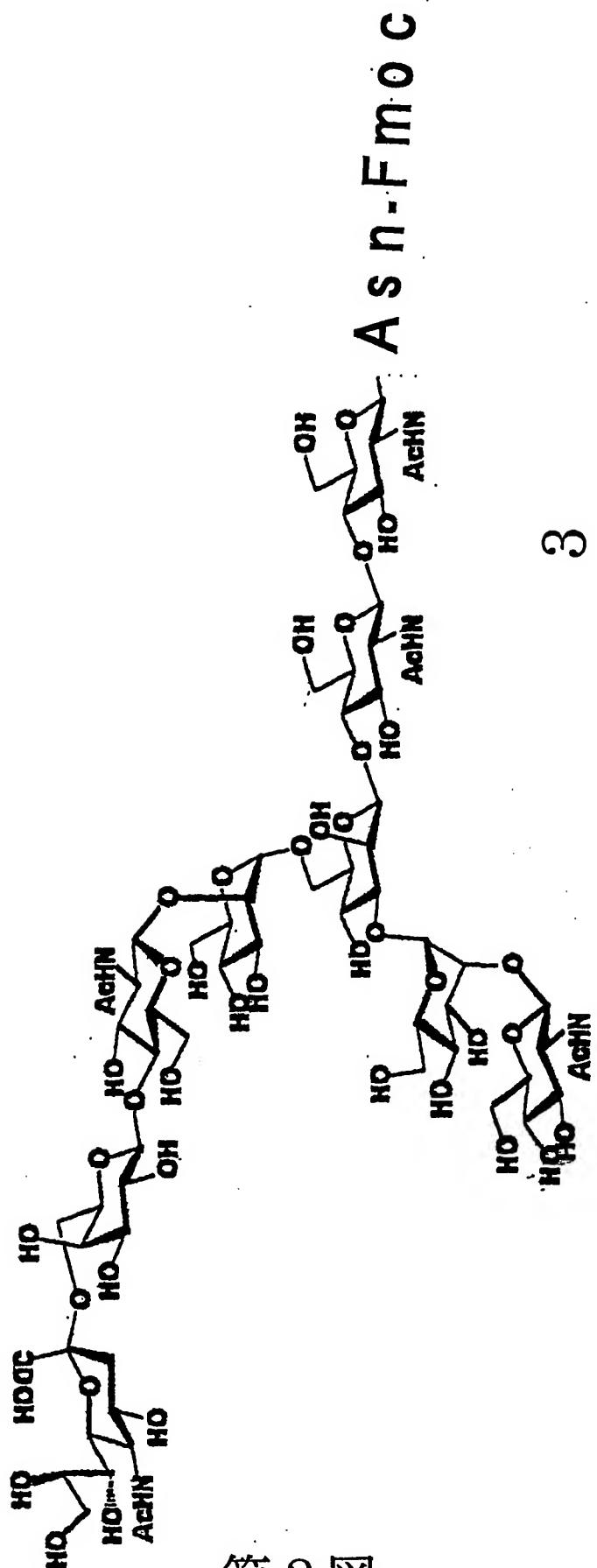
四



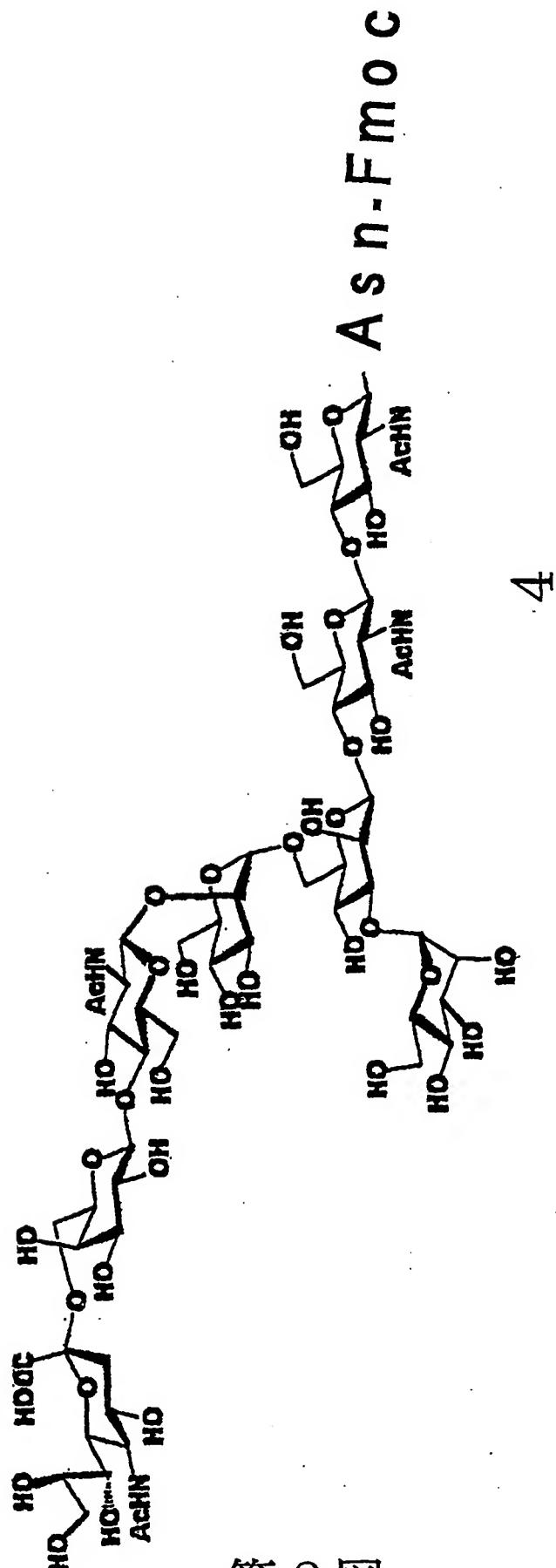
第1圖

1/11/12

差替え用紙 (規則26)

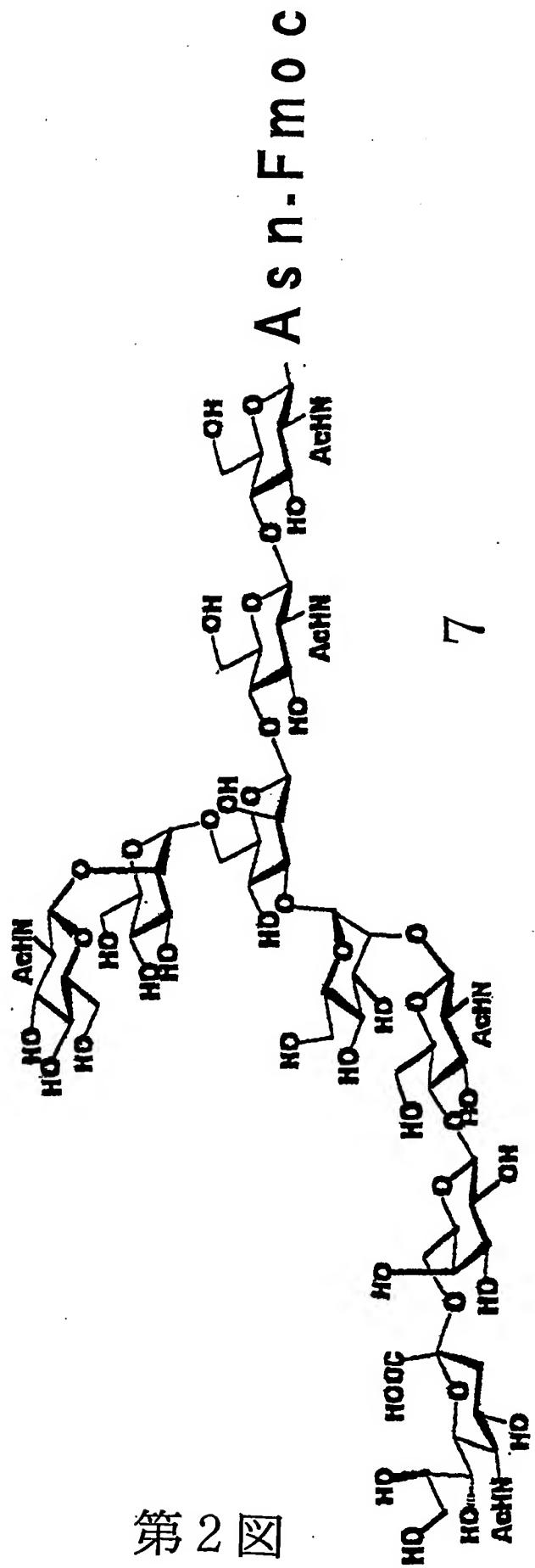


第2図



第 2 図

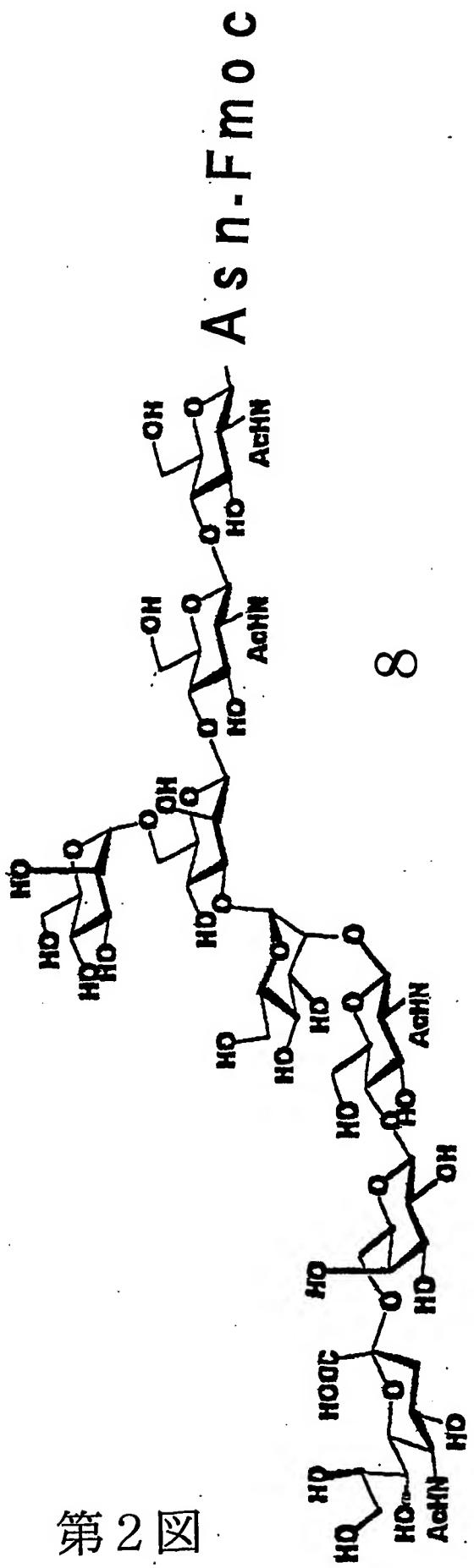
2/1/12



第2図

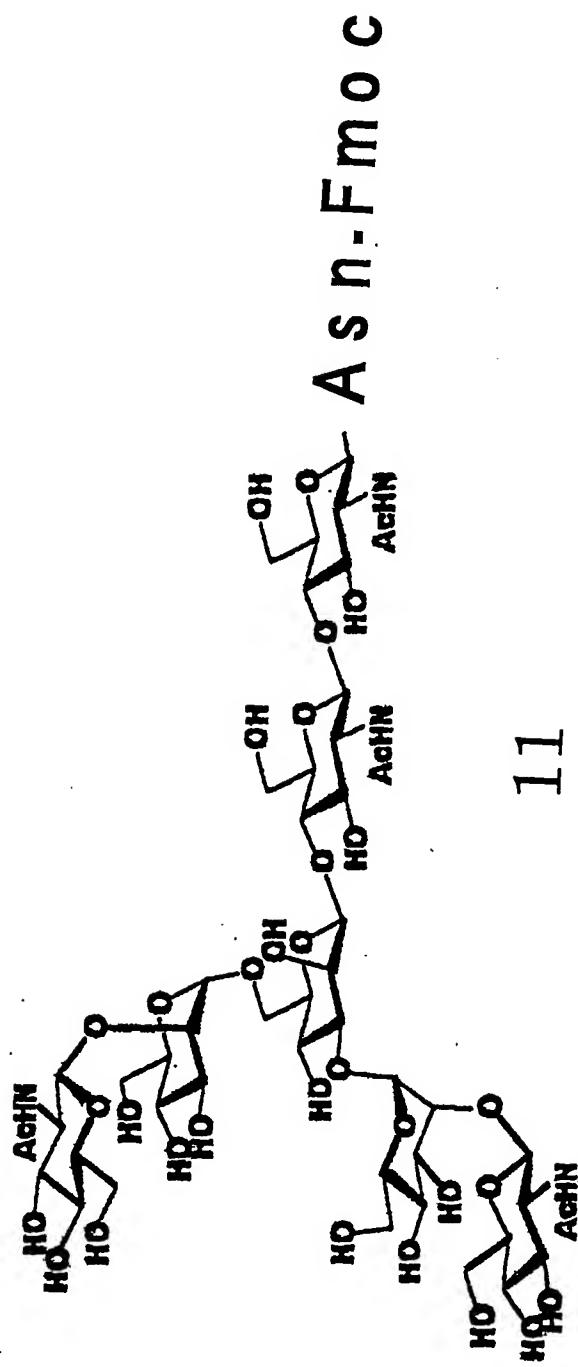
2/2/12

差替え用紙(規則26)



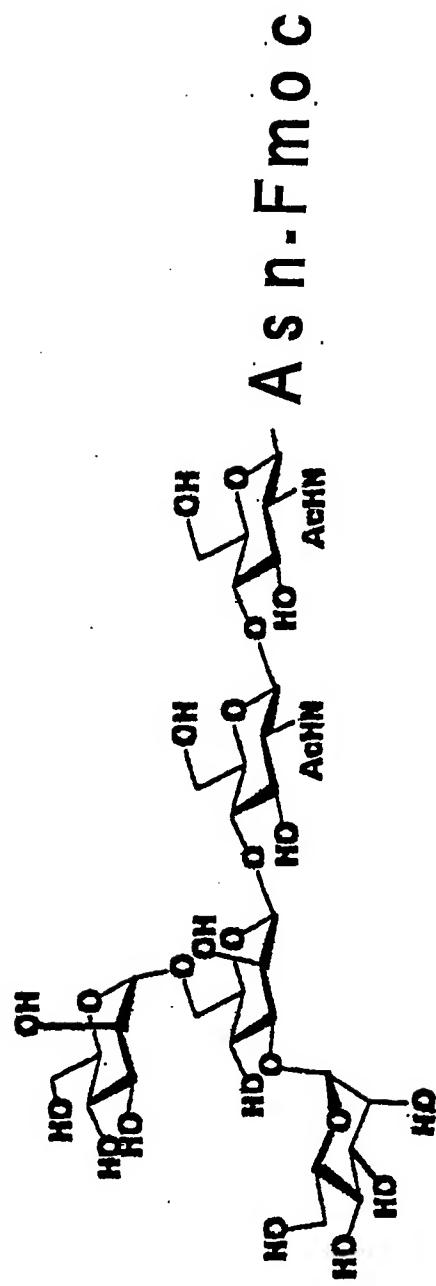
第2図

2/3/12



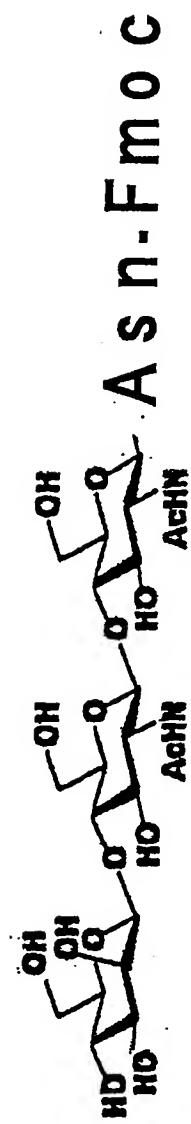
第2図

2/4/12



第2図

2/5/12



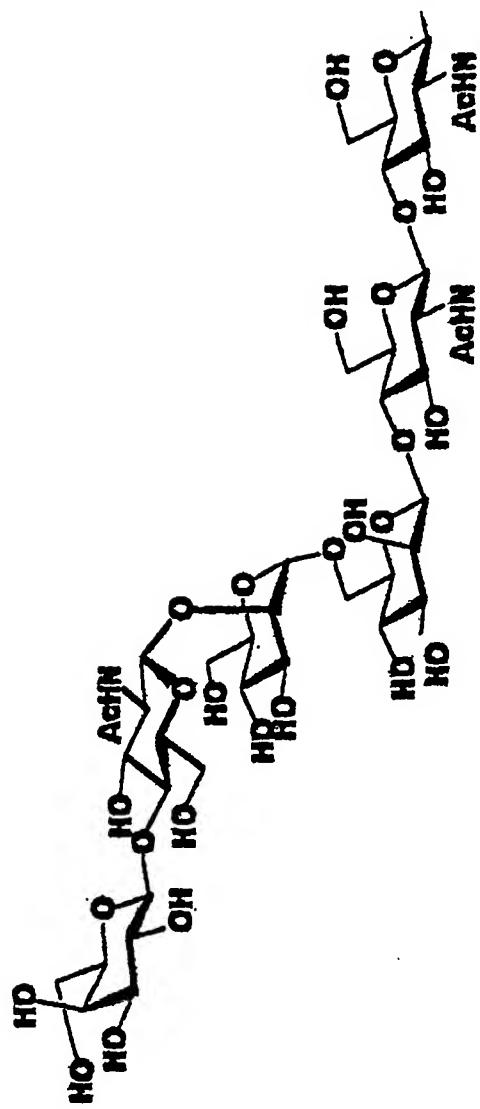
13

第2図

2/6/12

特許用紙(規則26)

Asn-FmoC



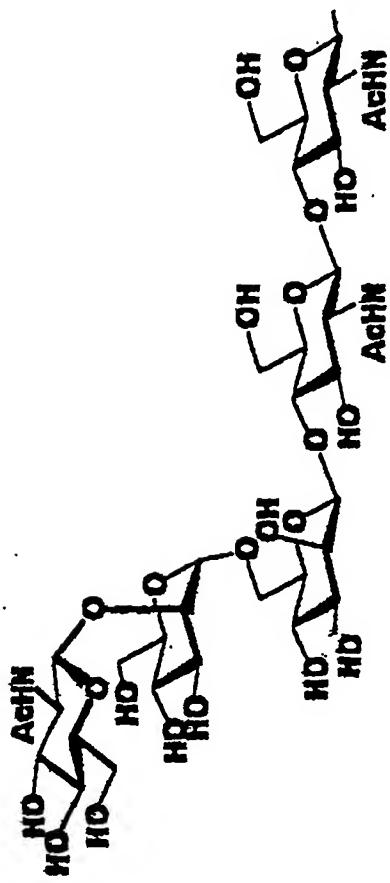
16

第2図

2/7/12

差替え用紙(規則26)

A s n - F m o C

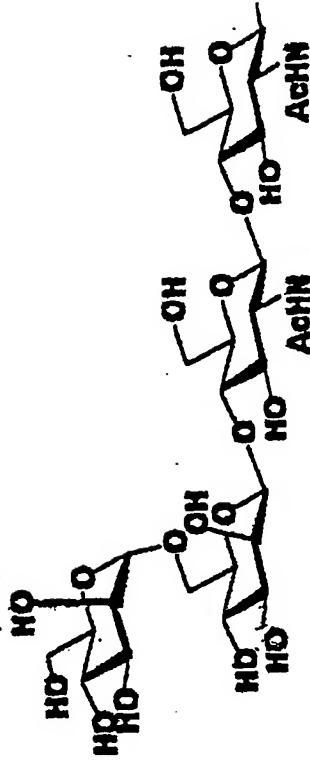


17

第2図

2/8/12

A s n - F m o c

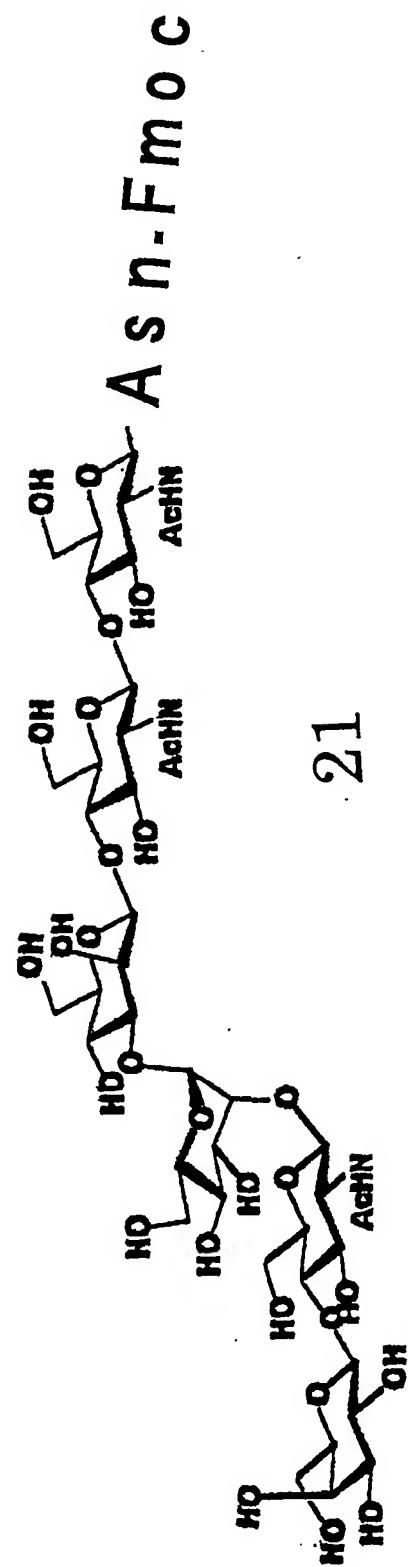


18

第2図

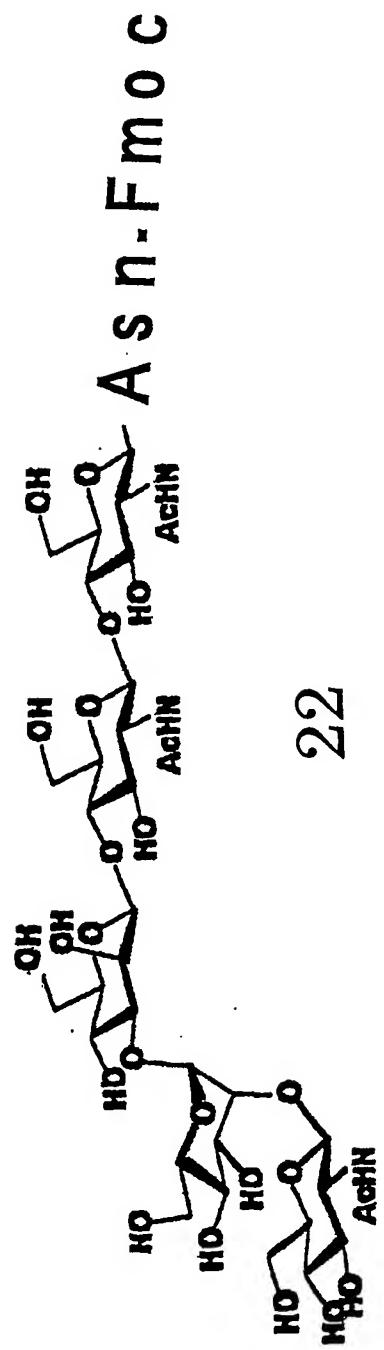
2/9/12

差替え用紙(規則26)



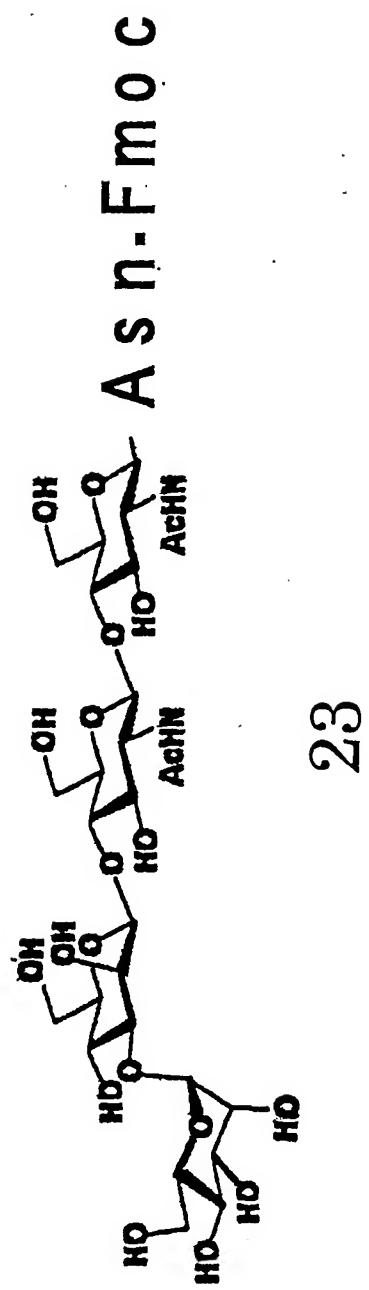
第2図

2/10/12



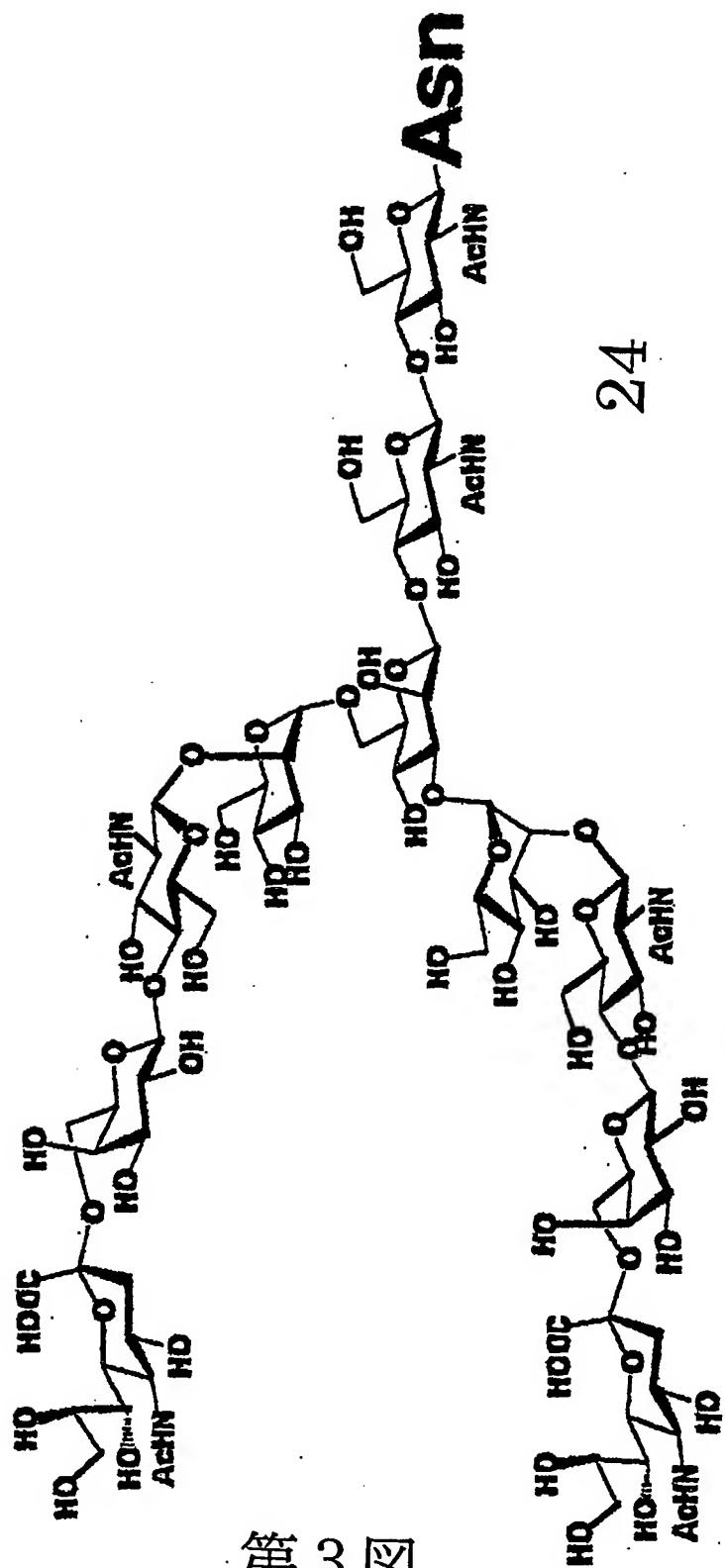
第2図

2/11/12

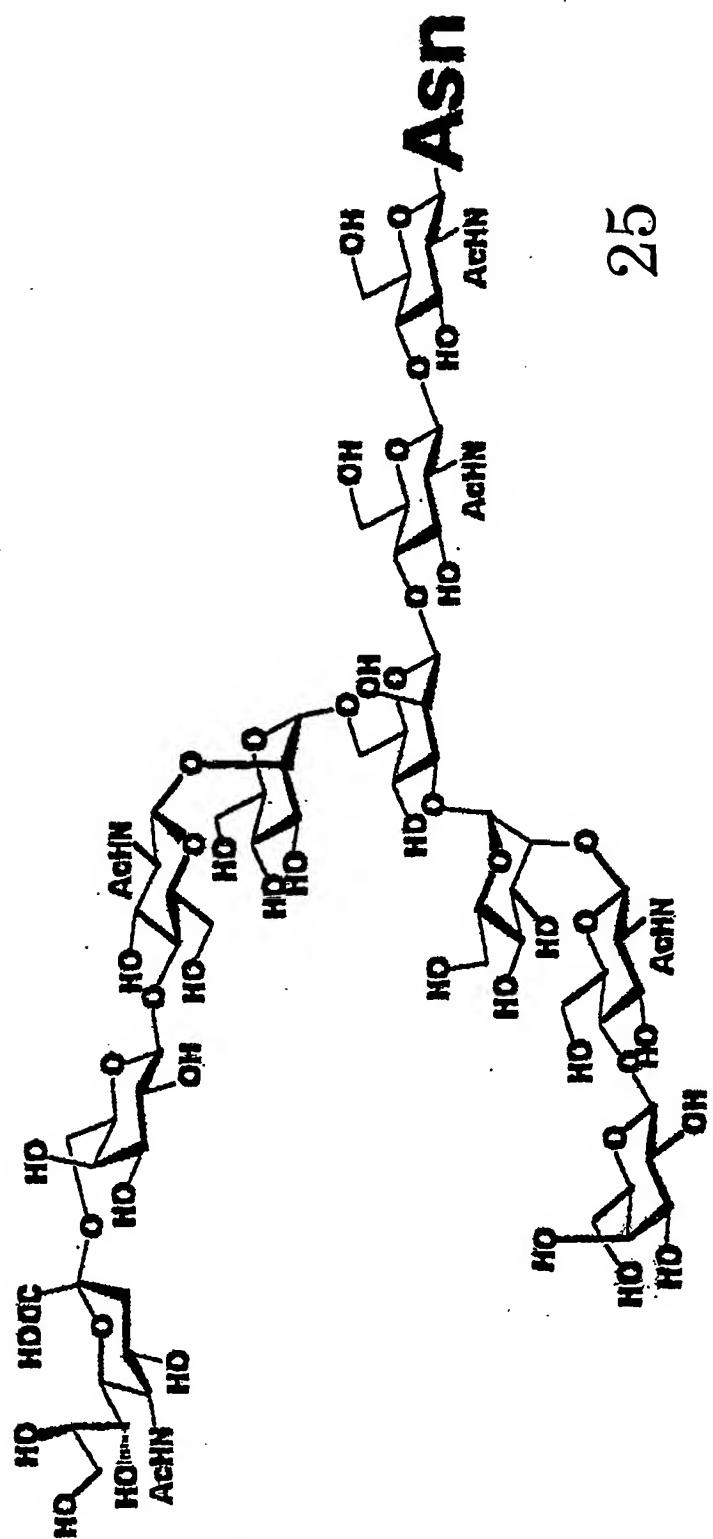


第2図

2/12/12



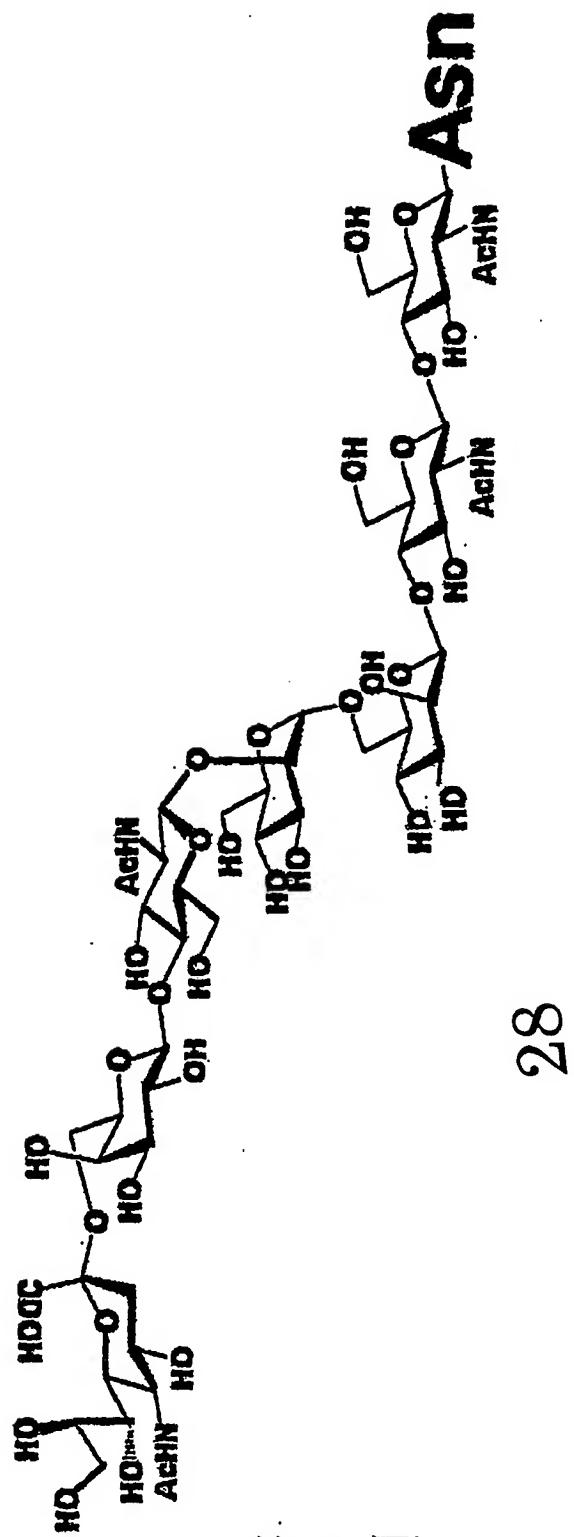
第3図



第3図

3/1/12

差替え用紙(規則26)

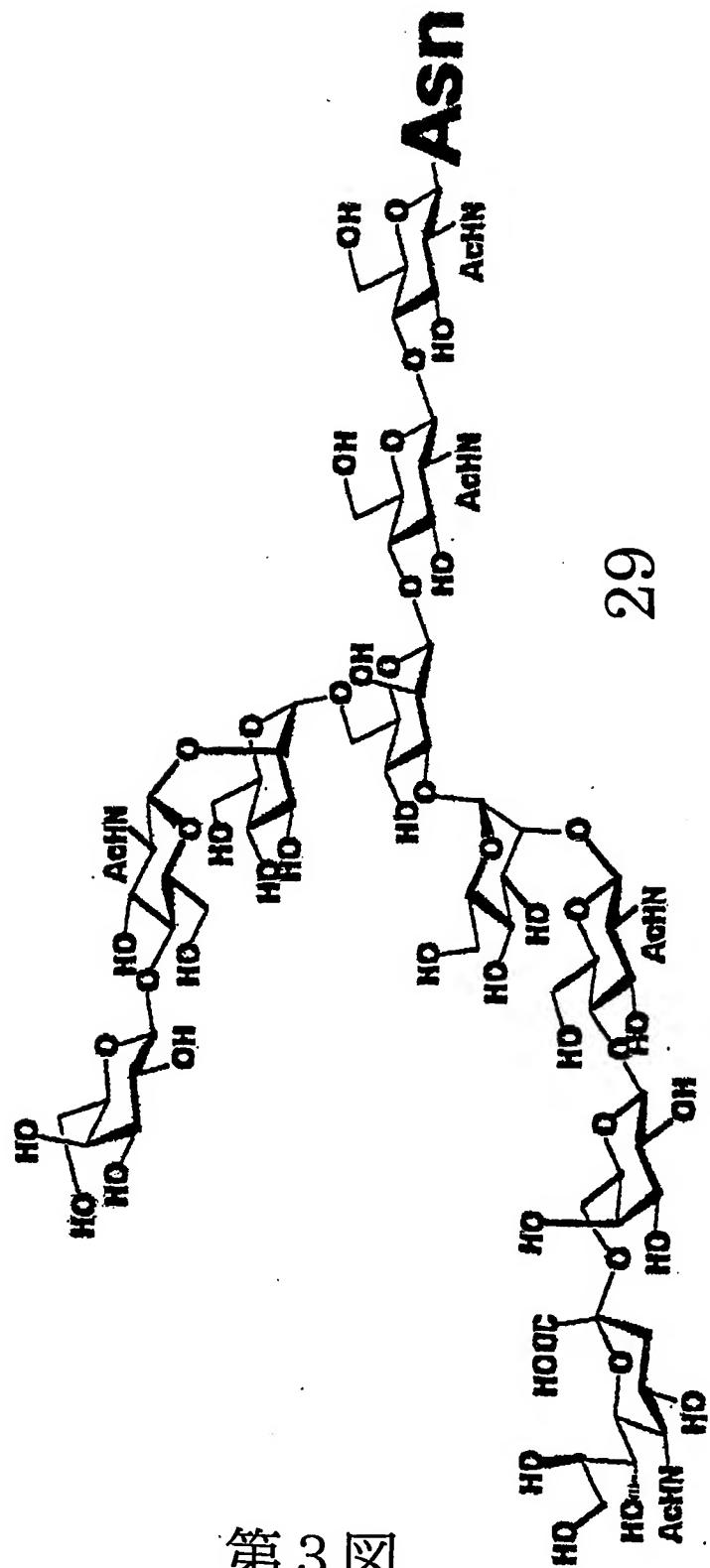


28

第3図

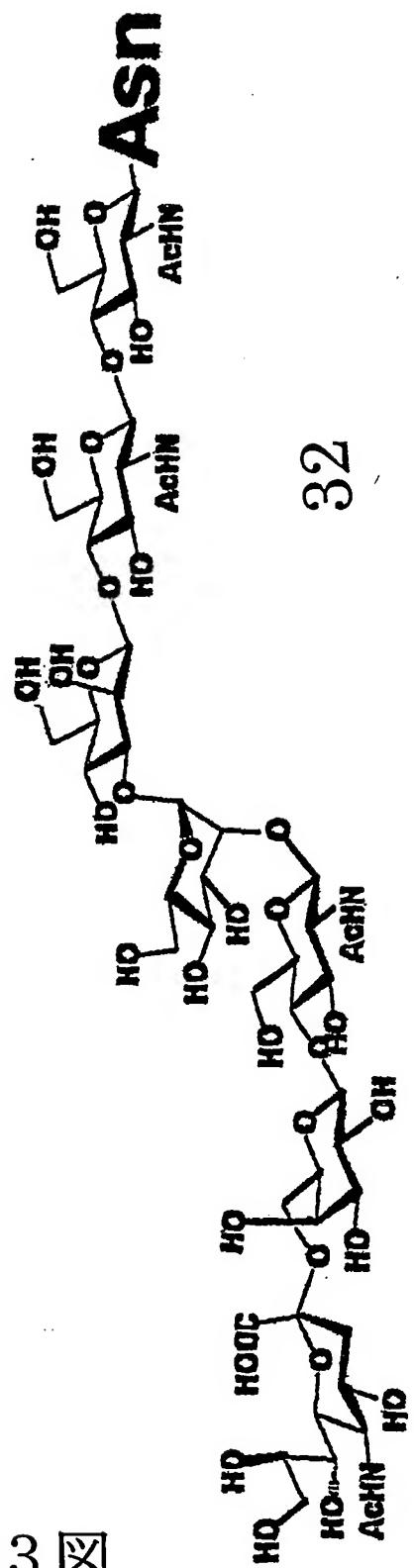
3/2/12

差替え用紙(規則26)



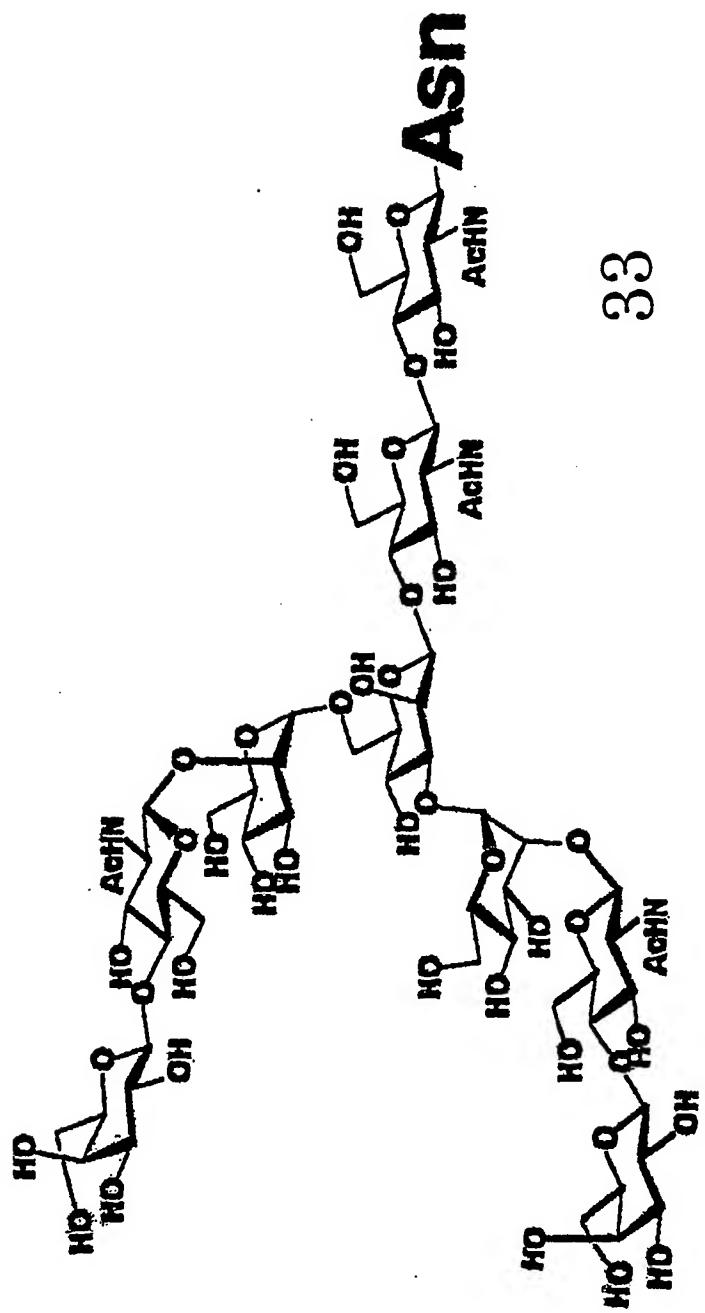
第3回

3/3/12



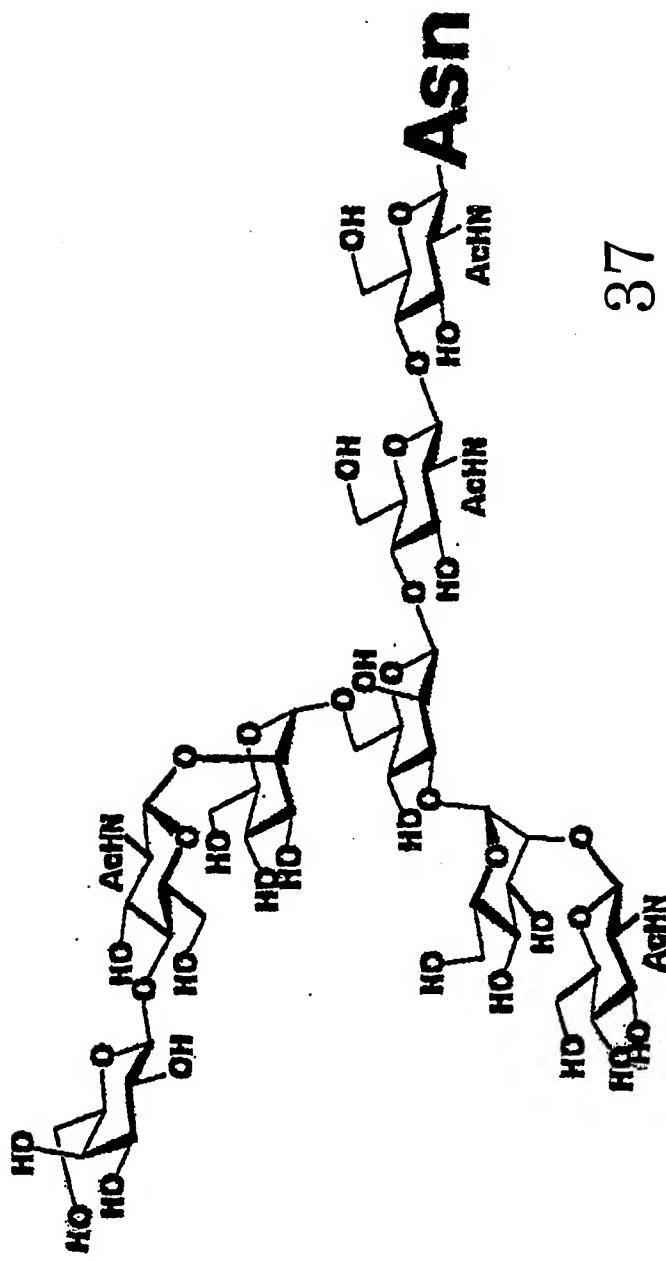
第3回

3/4/12



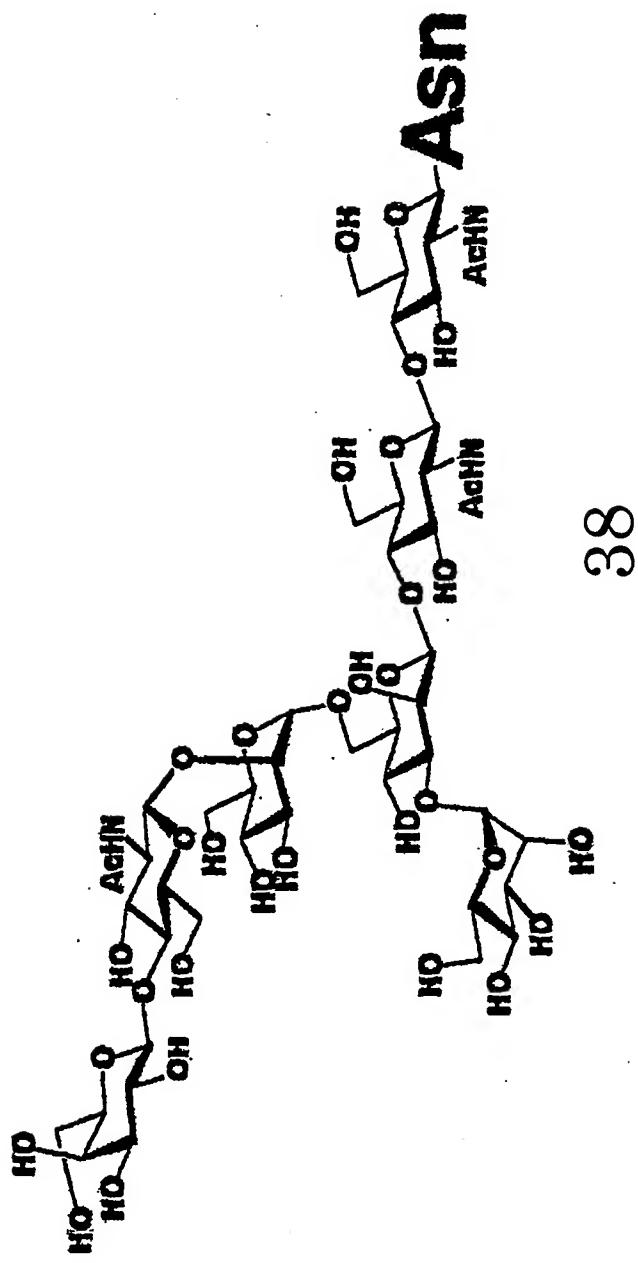
第3図

3/5/12



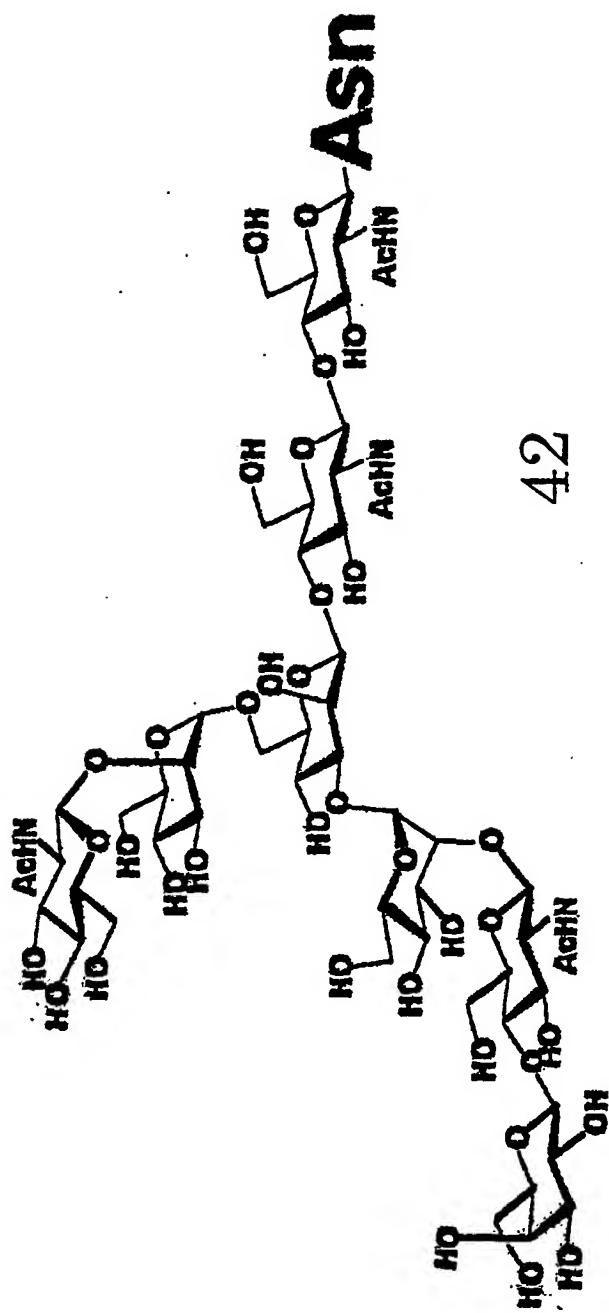
第3図

3/6/12



第3図

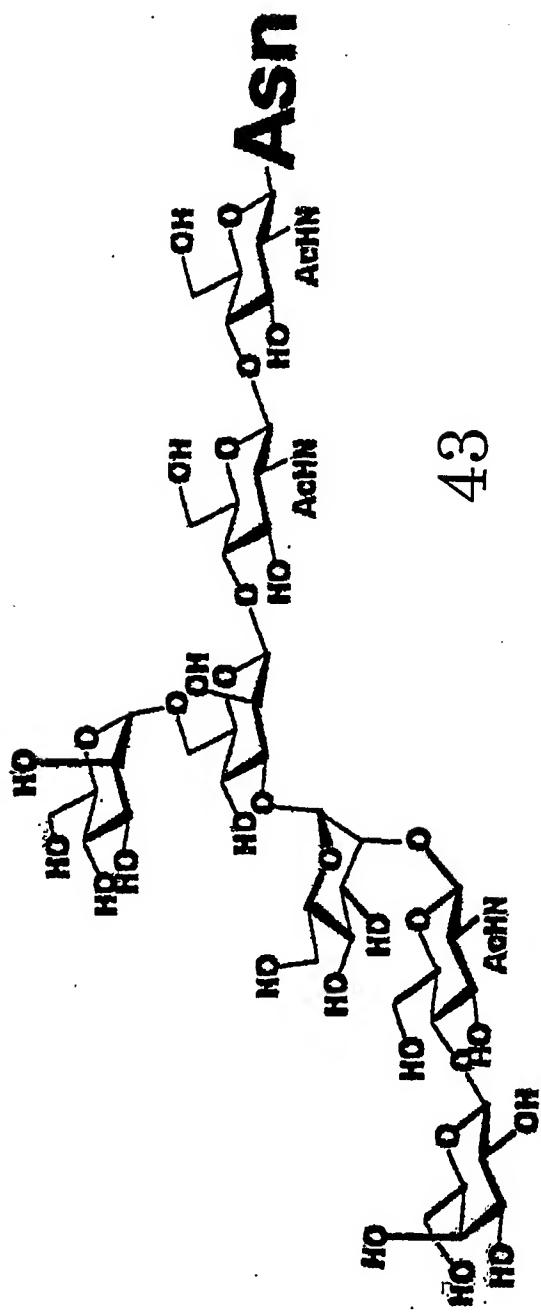
3/7/12



第3図

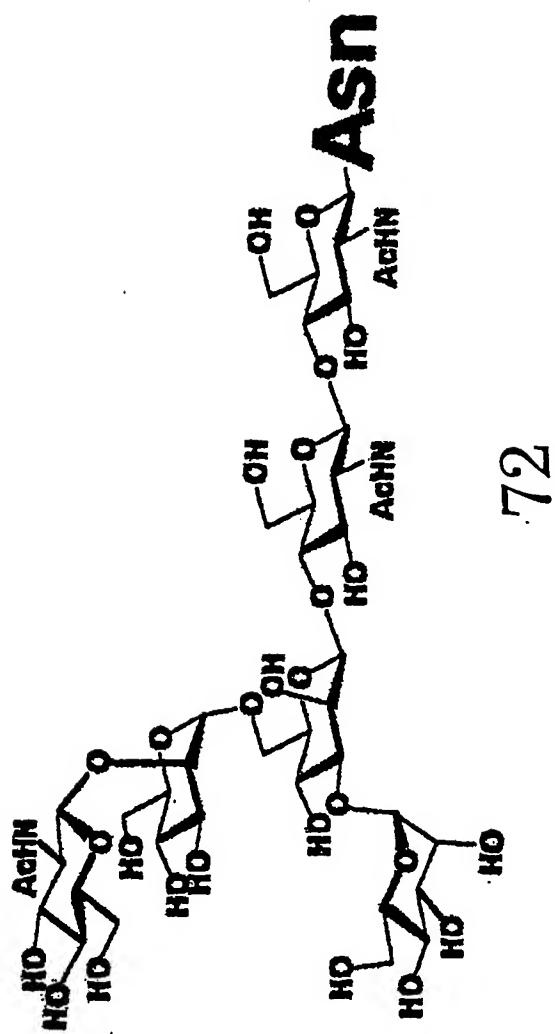
3/8/12

機関之用紙(規則26)



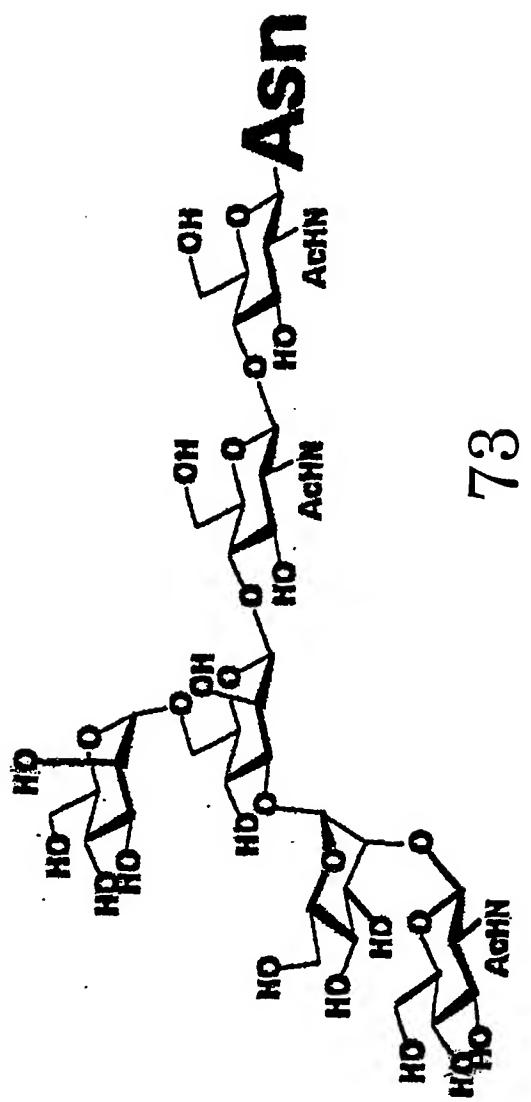
第3図

3/9/12



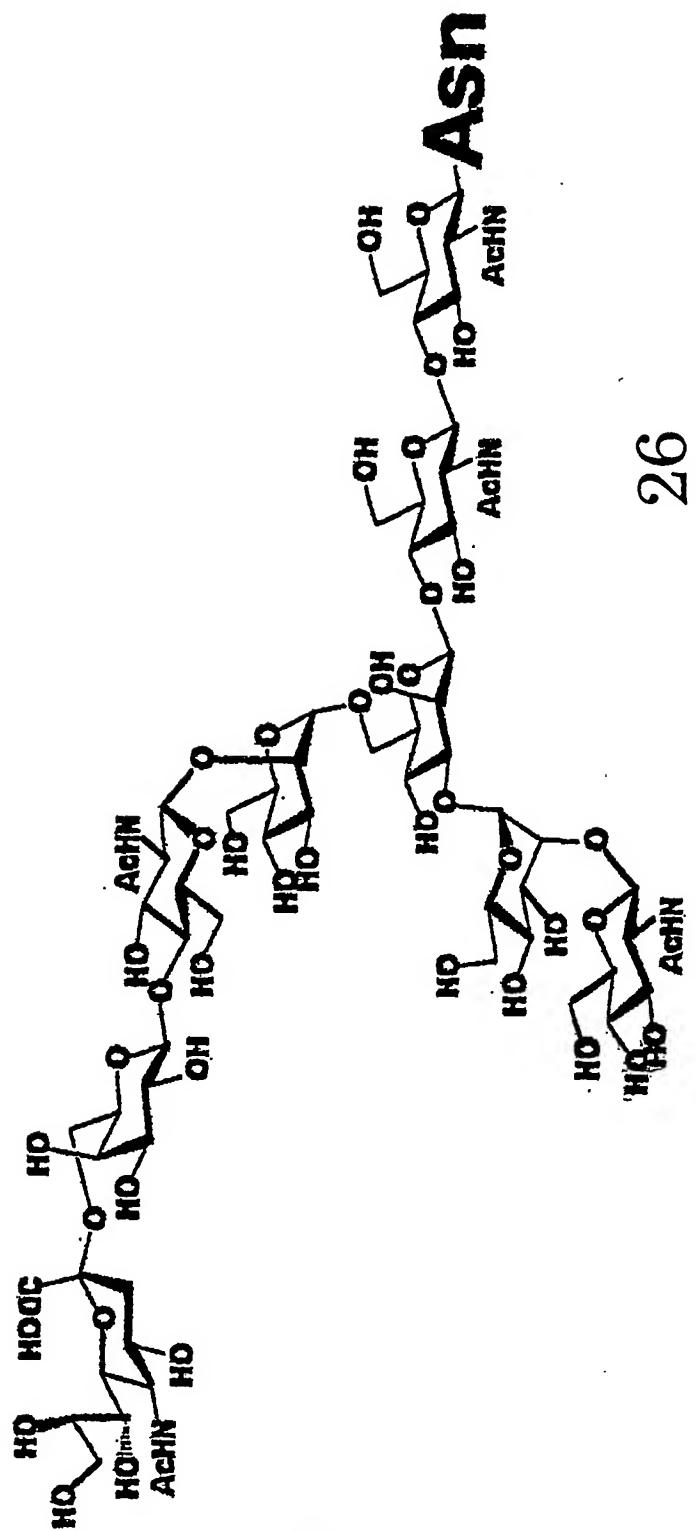
第3図

3/10/12

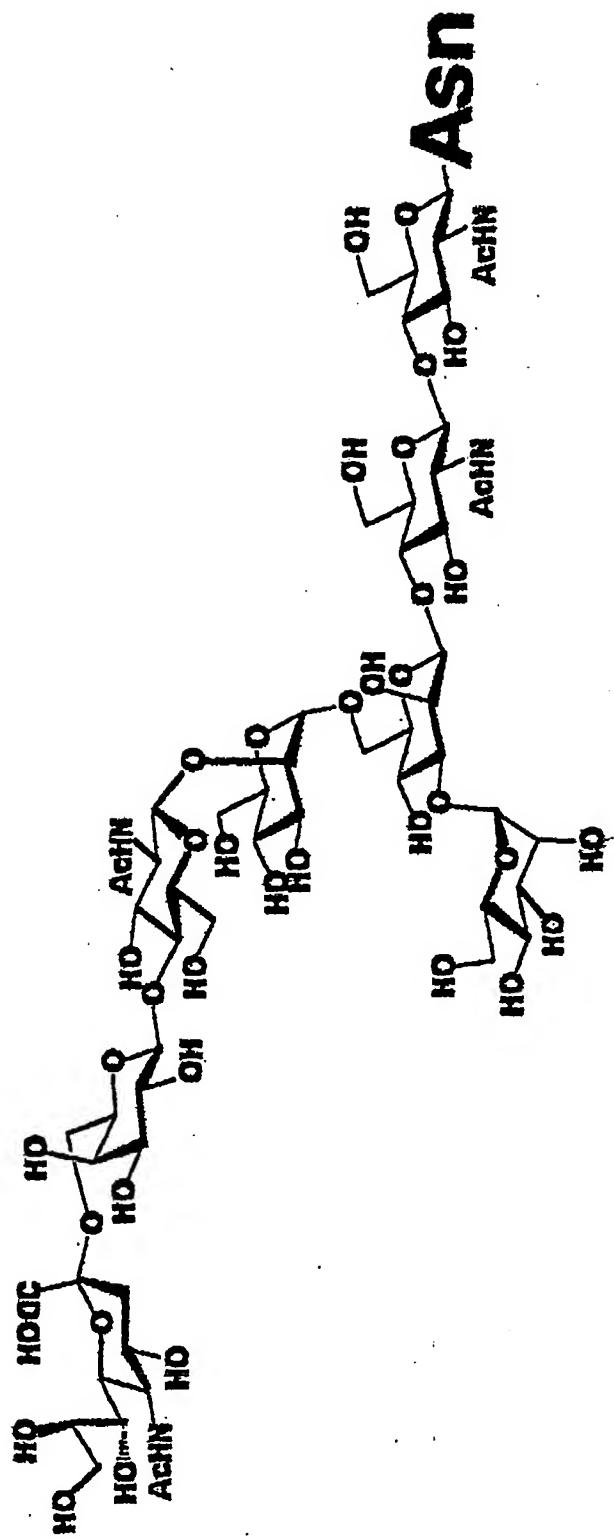


第3図

3/11/12



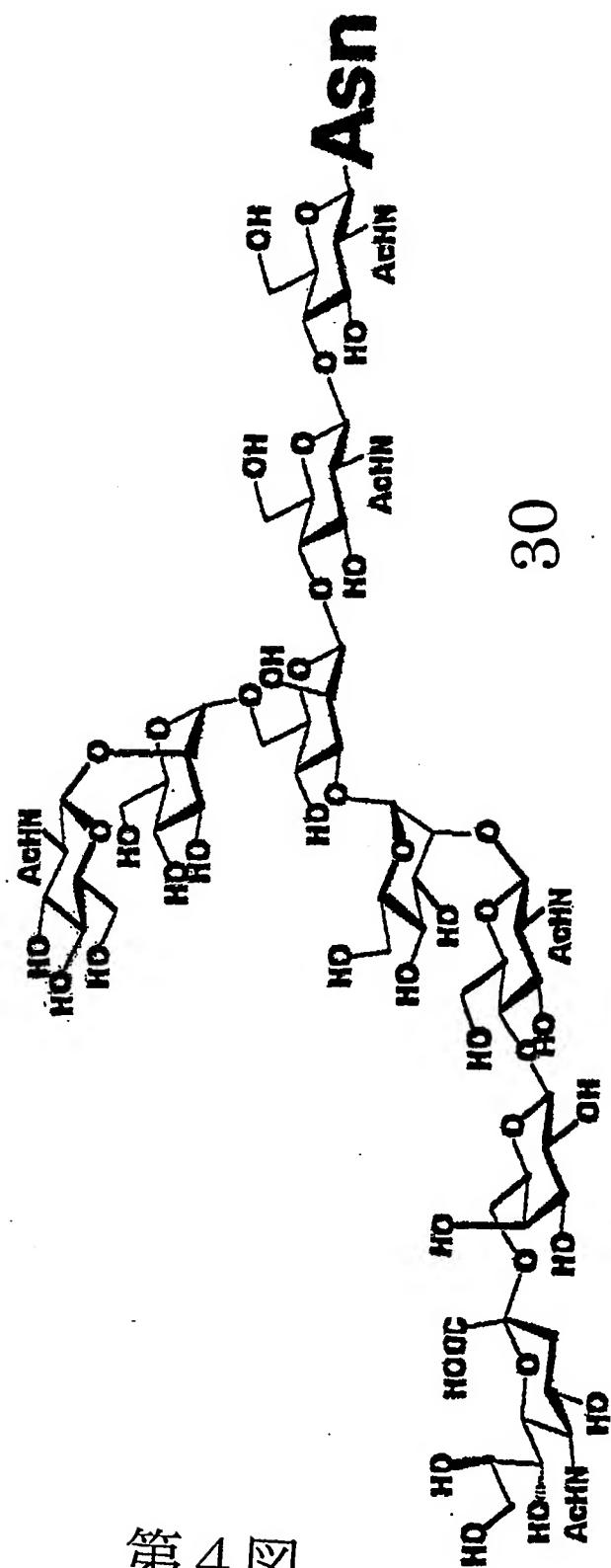
第4図



27

第4図

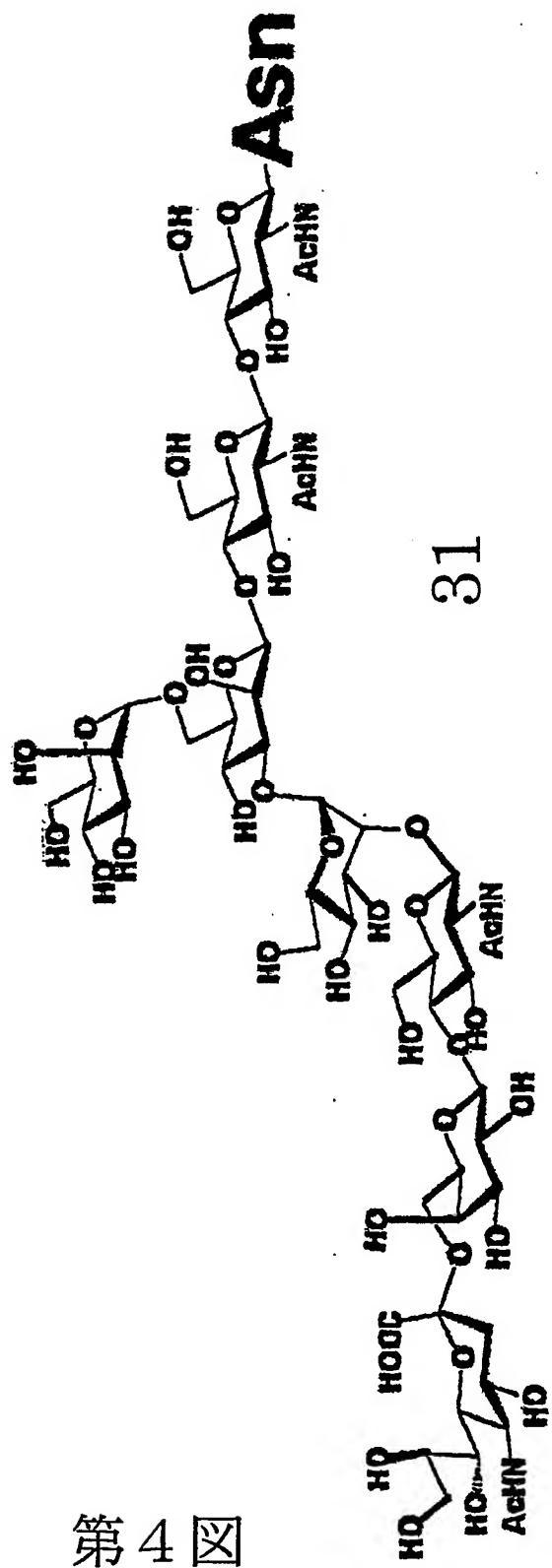
4/1/12



第4回

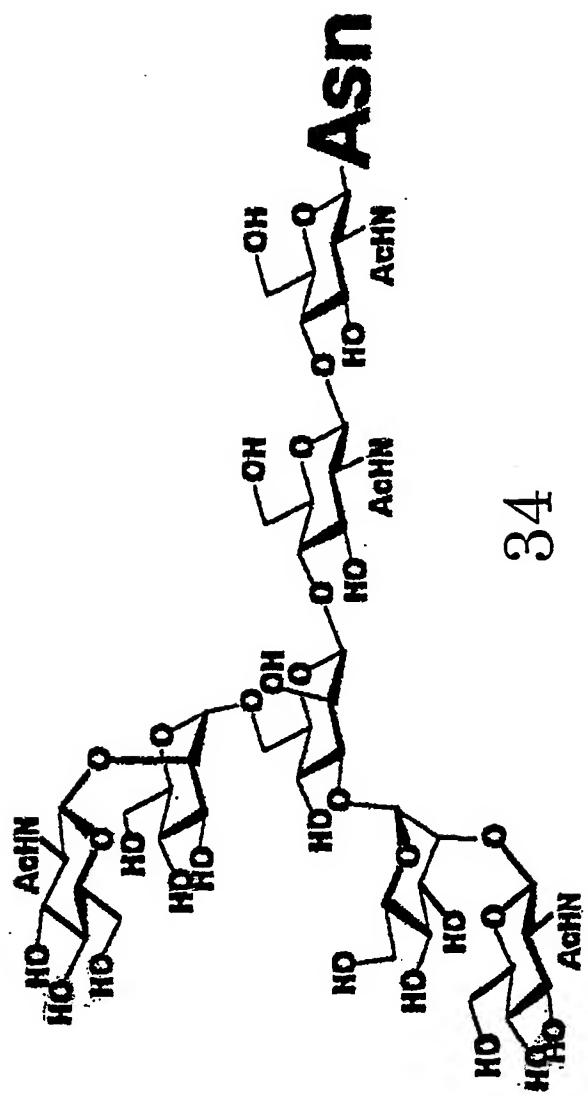
4/2/12

差替え用紙(規則26)



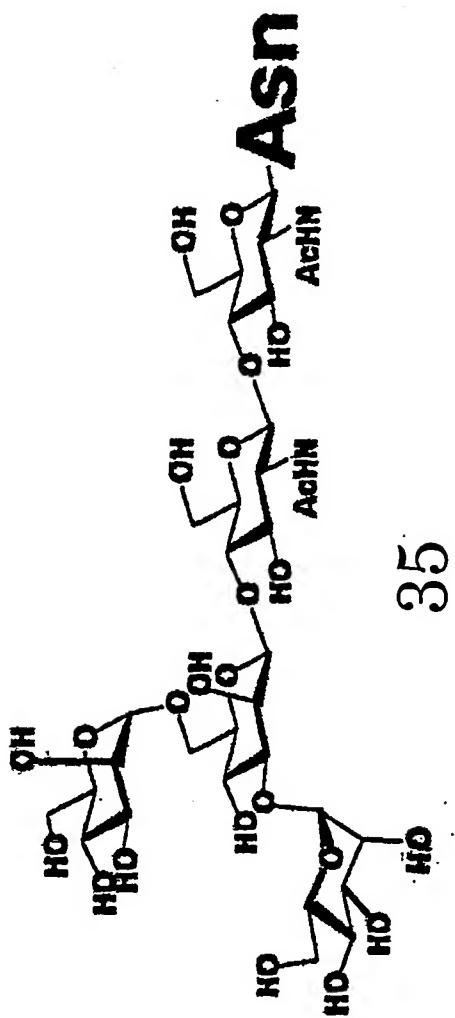
第4回

4/3/12



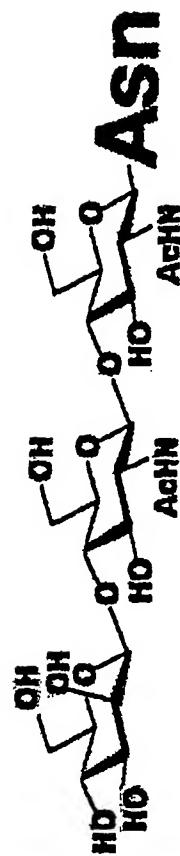
第4図

4/4/12



第4図

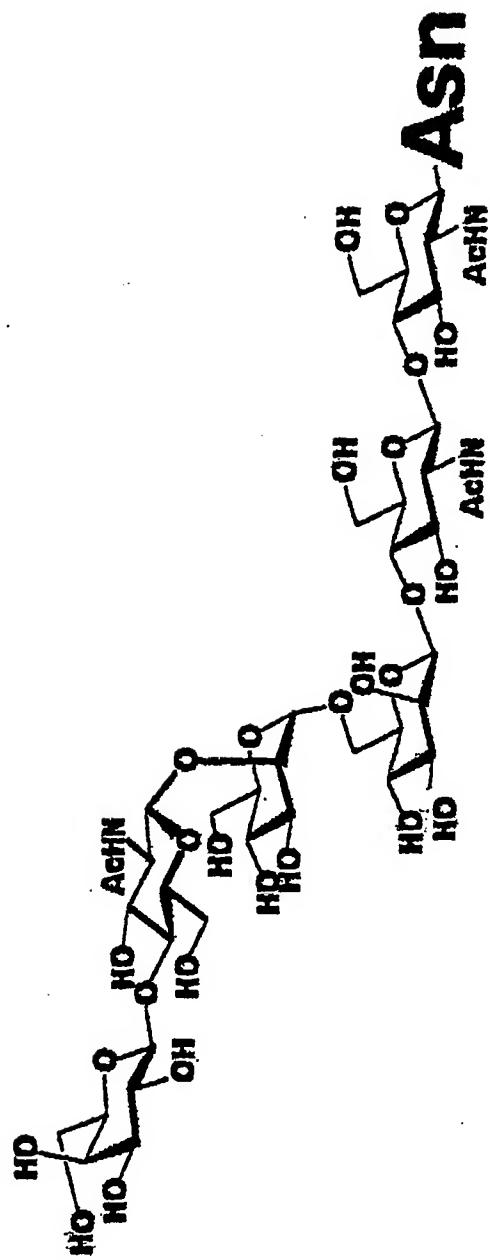
4/5/12



36

第4図

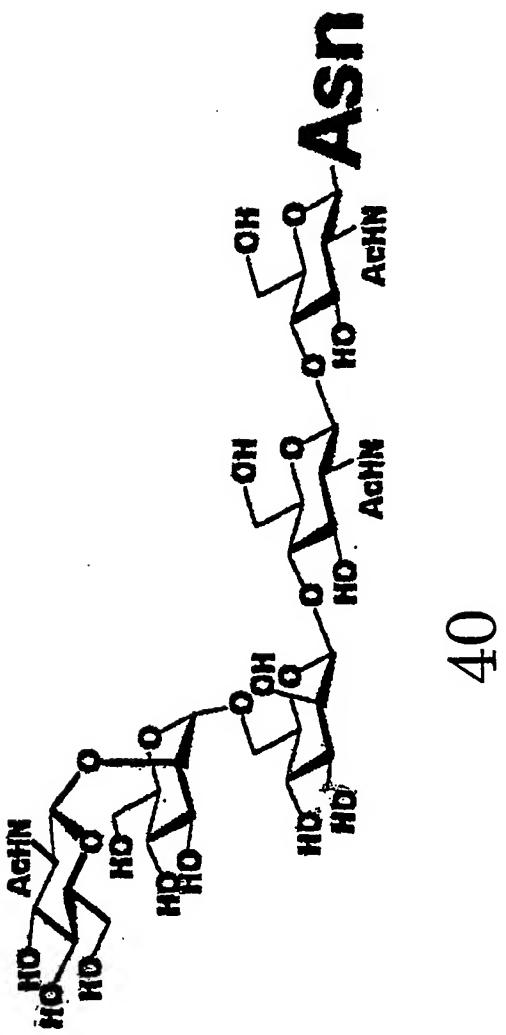
4/6/12



39

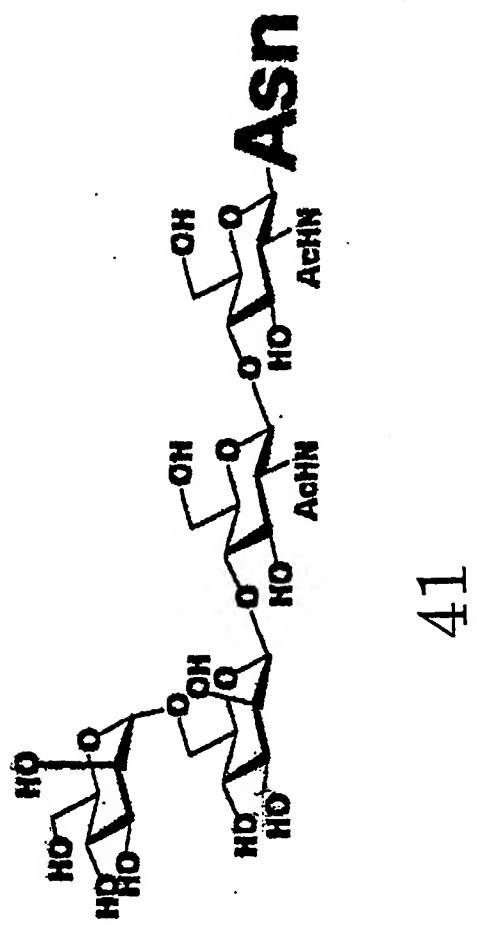
第4図

4/7/12



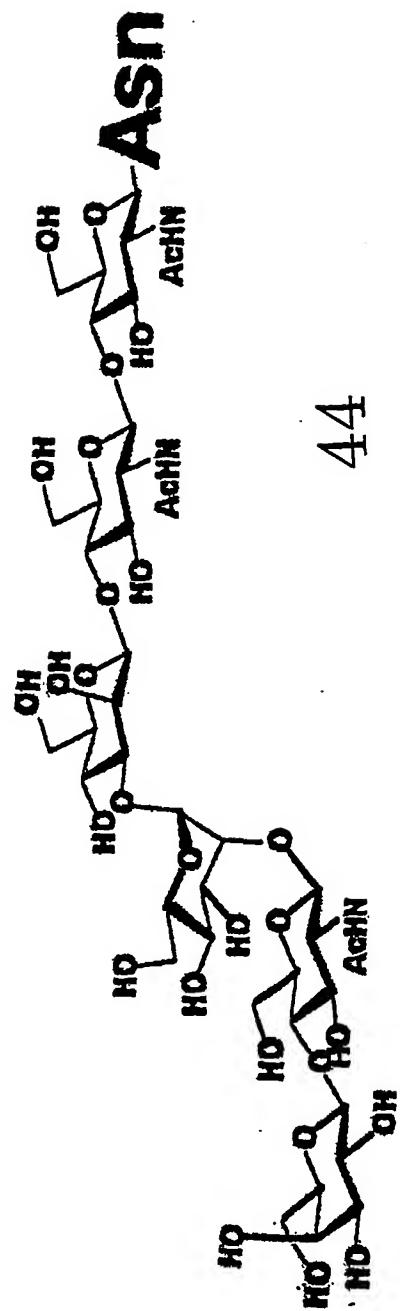
第4図

4/8/12



第4図

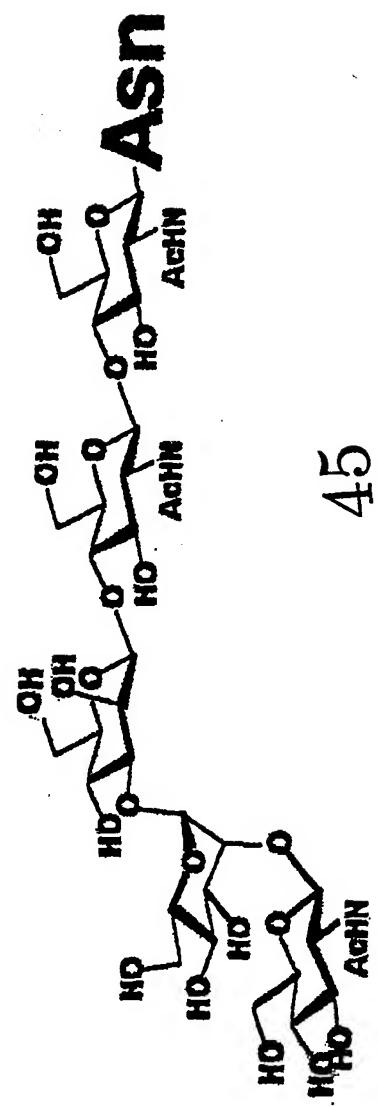
4/9/12



第4図

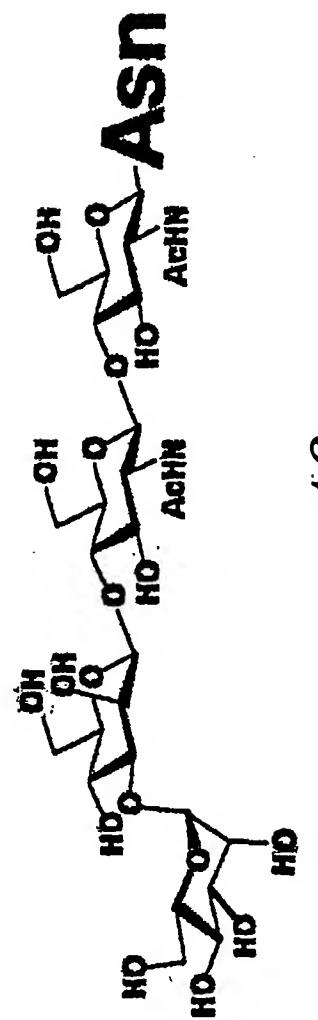
4/10/12

特許用紙(規則26)



第4図

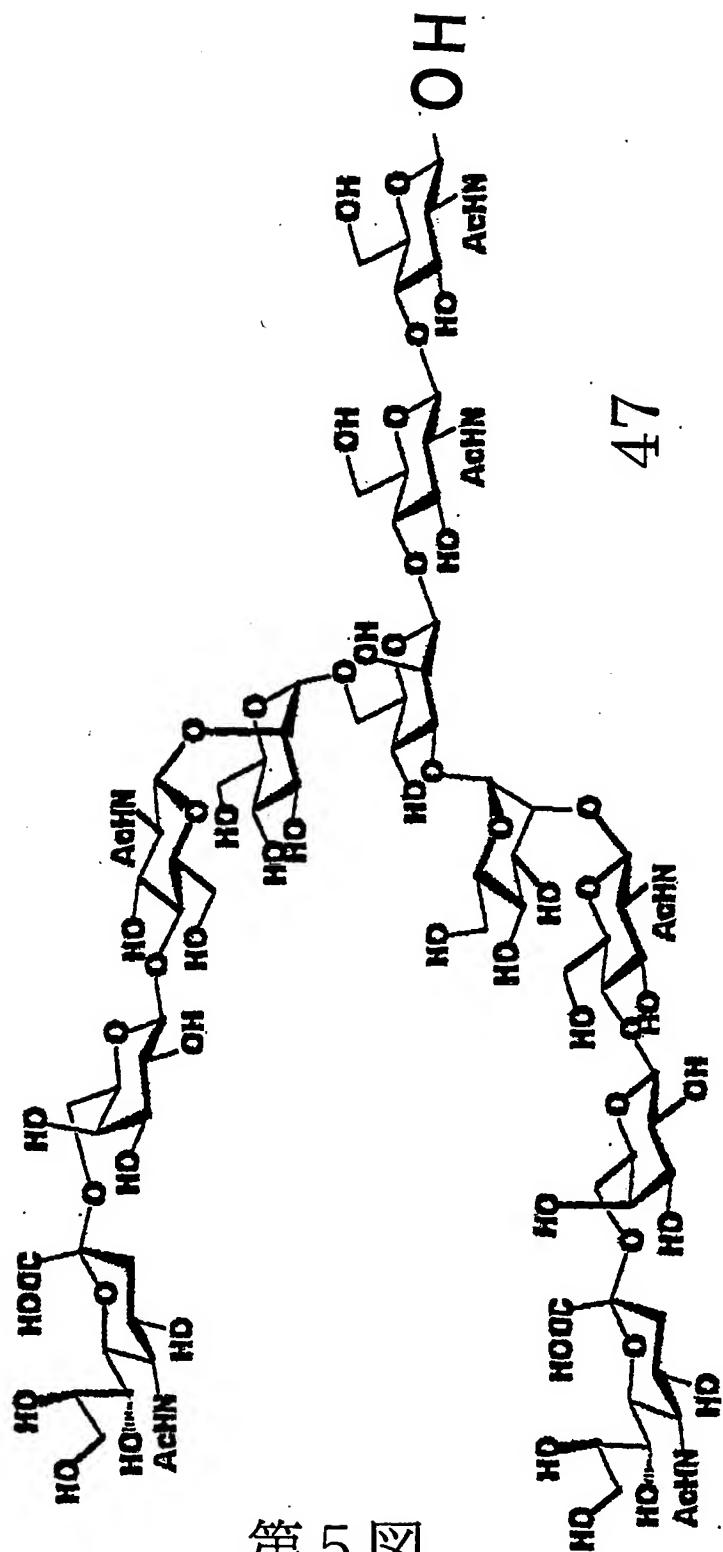
4/11/12



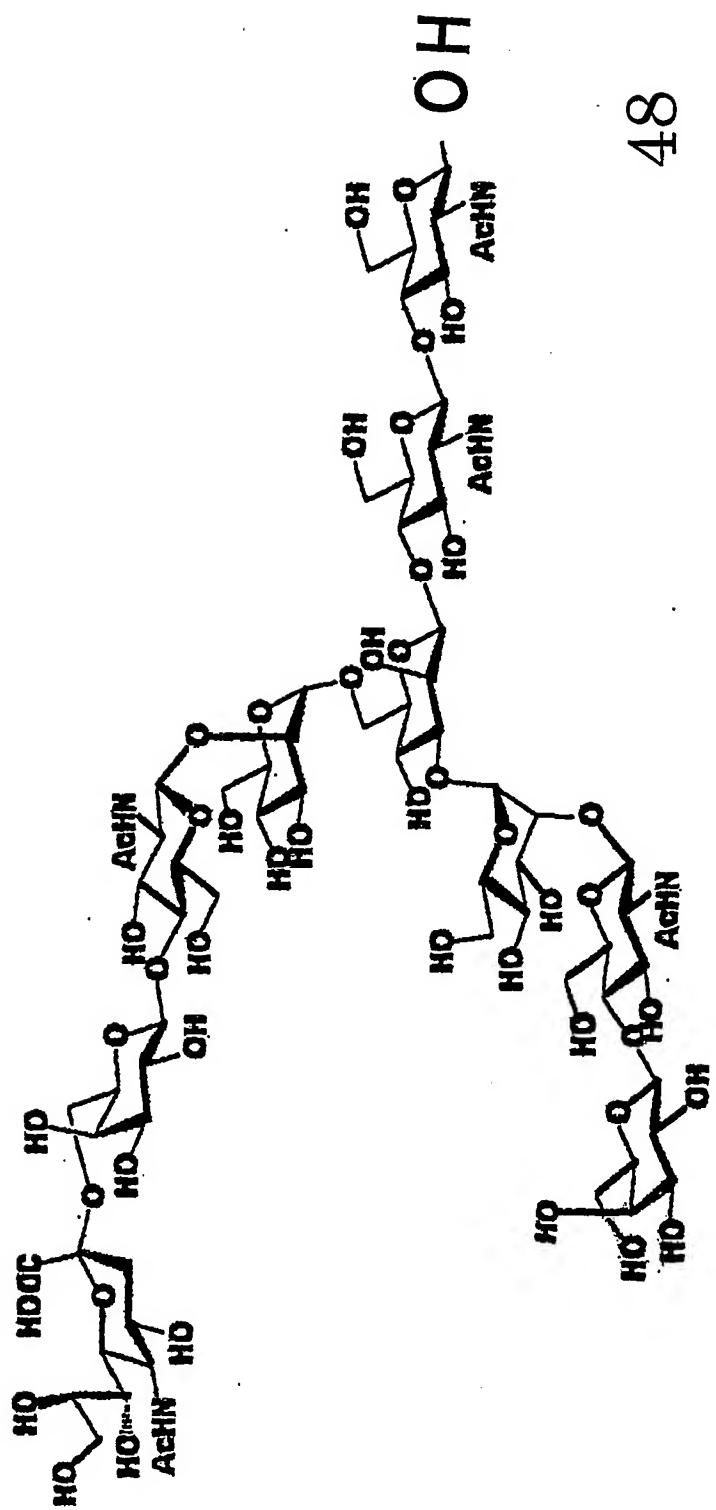
46

第4図

4/12/12

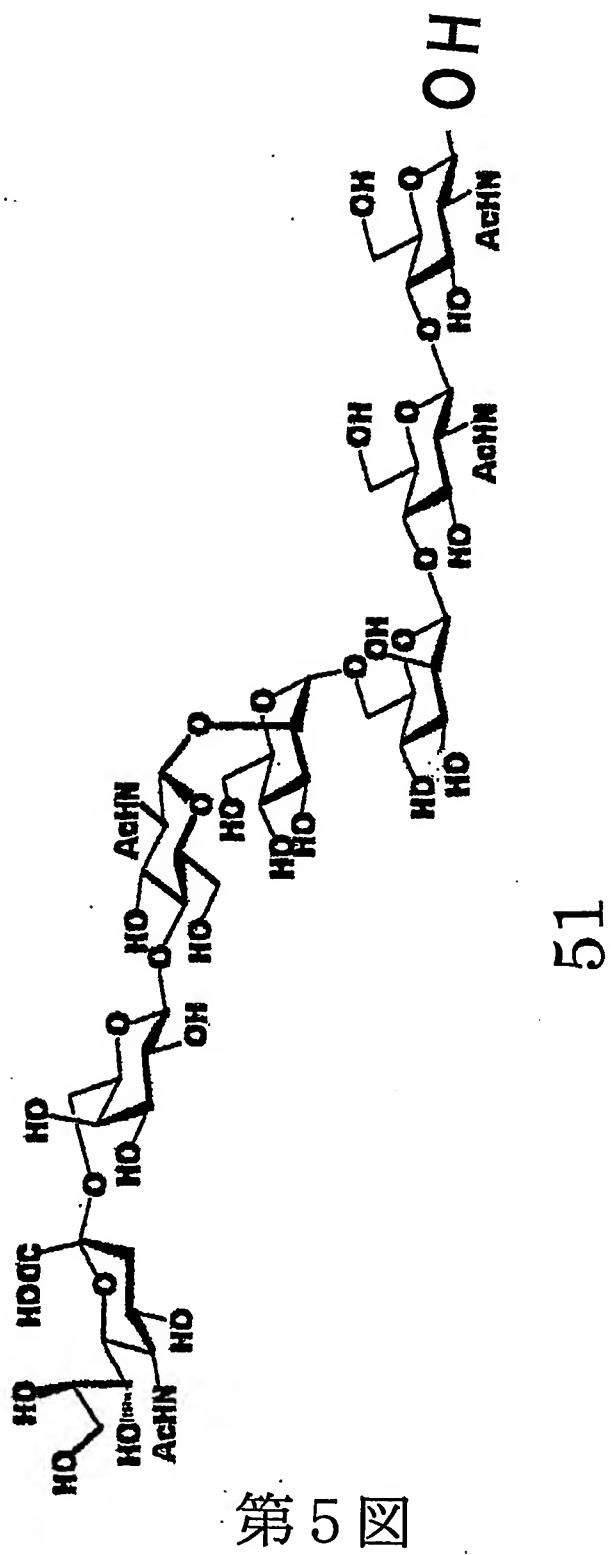


第5図



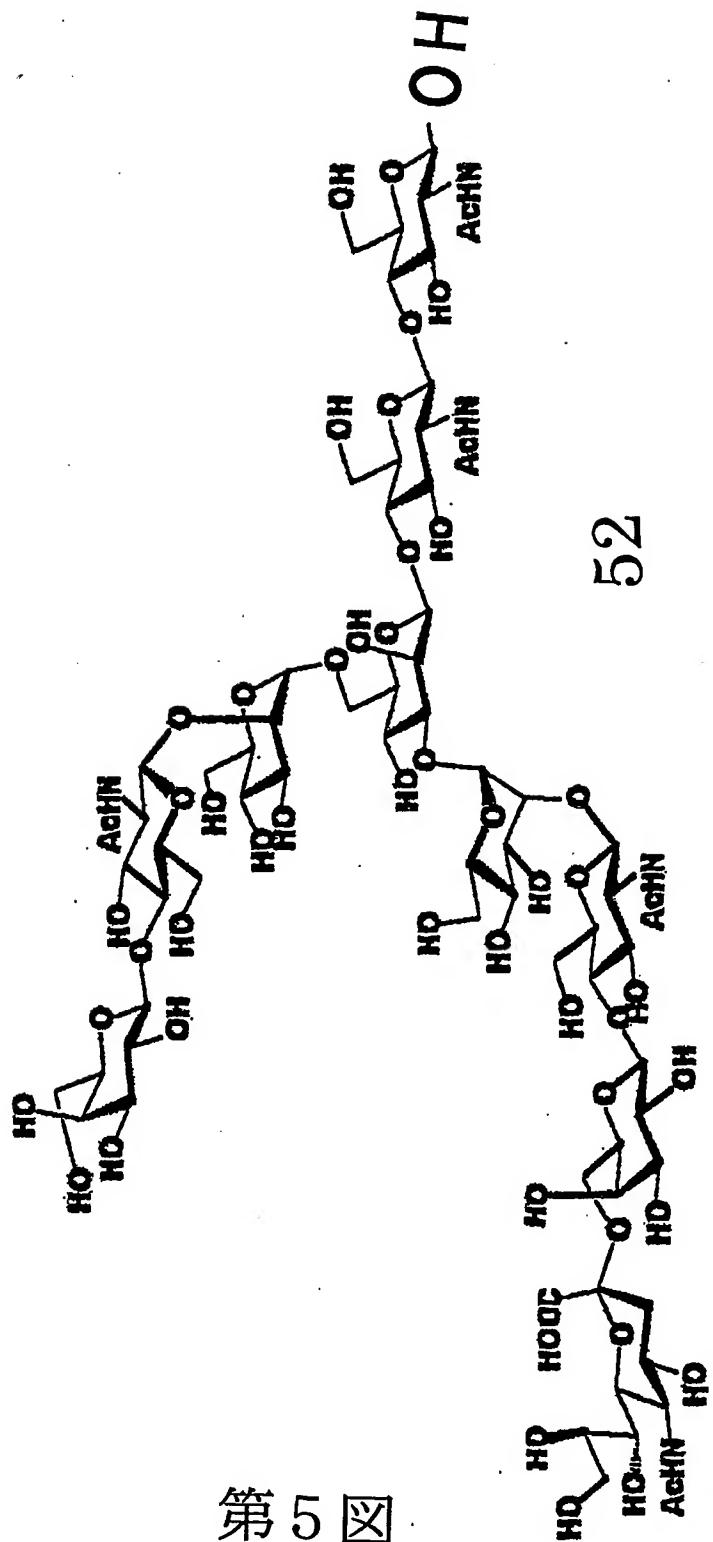
第5図

5/1/12



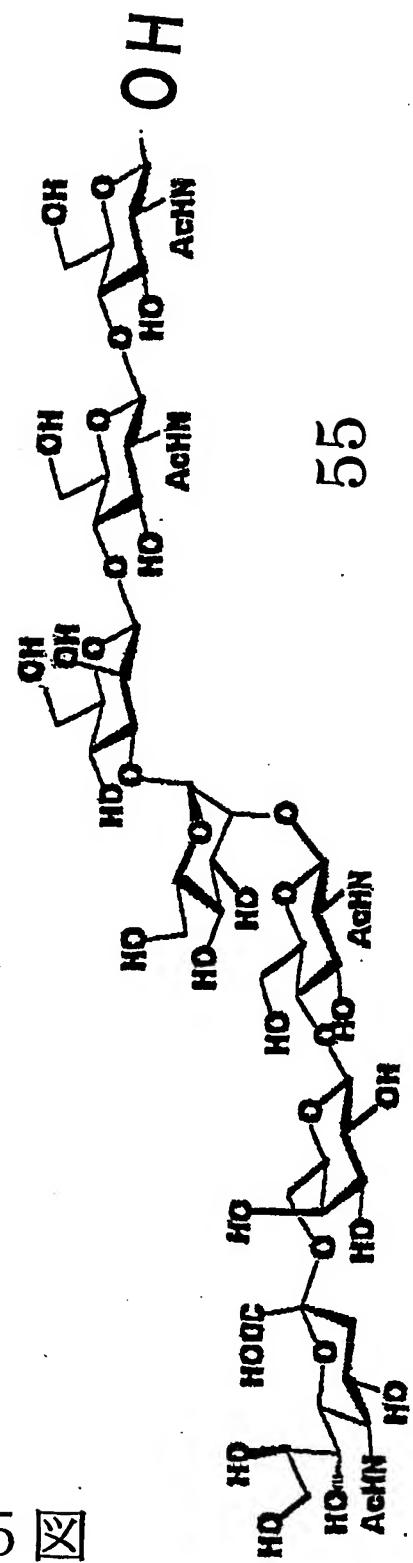
第5図

5/2/12



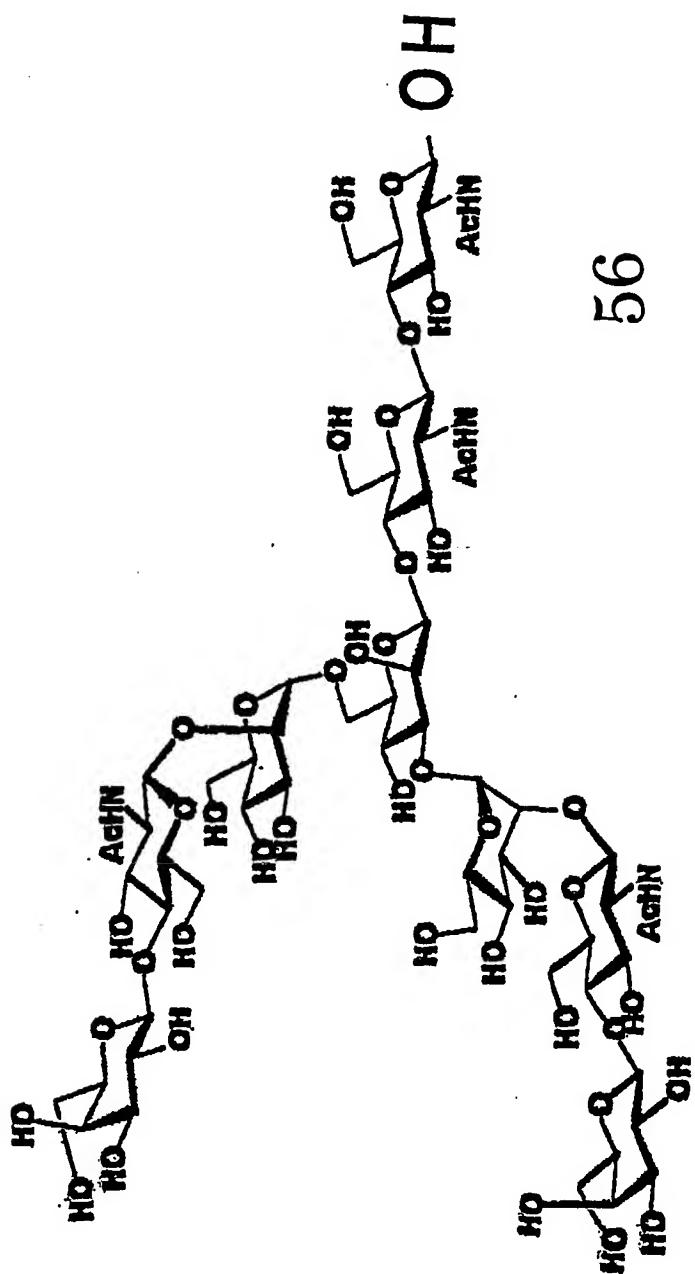
第5図

5/3/12



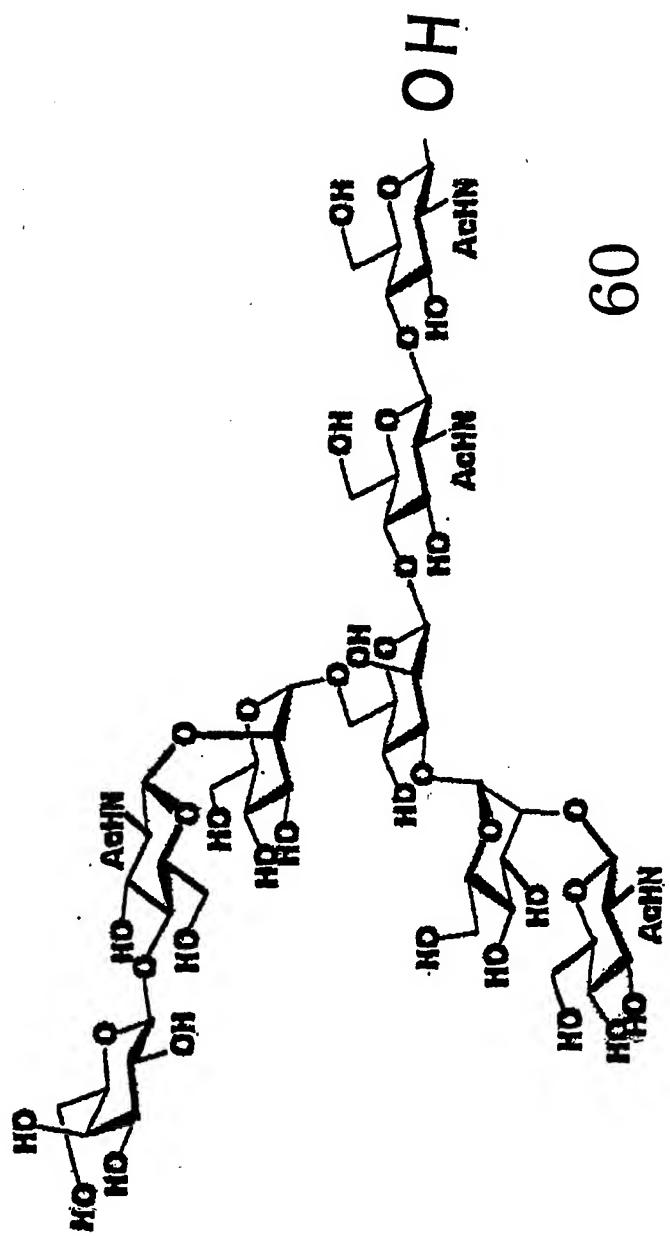
第5図

5/4/12



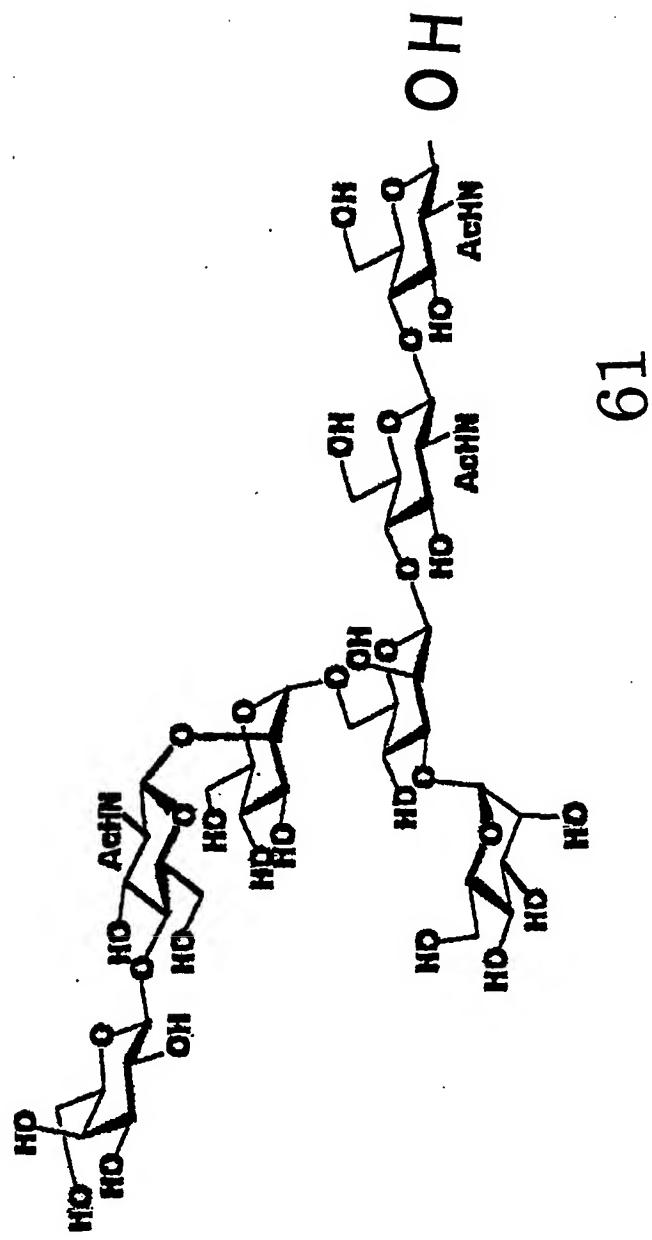
第5図

5/5/12



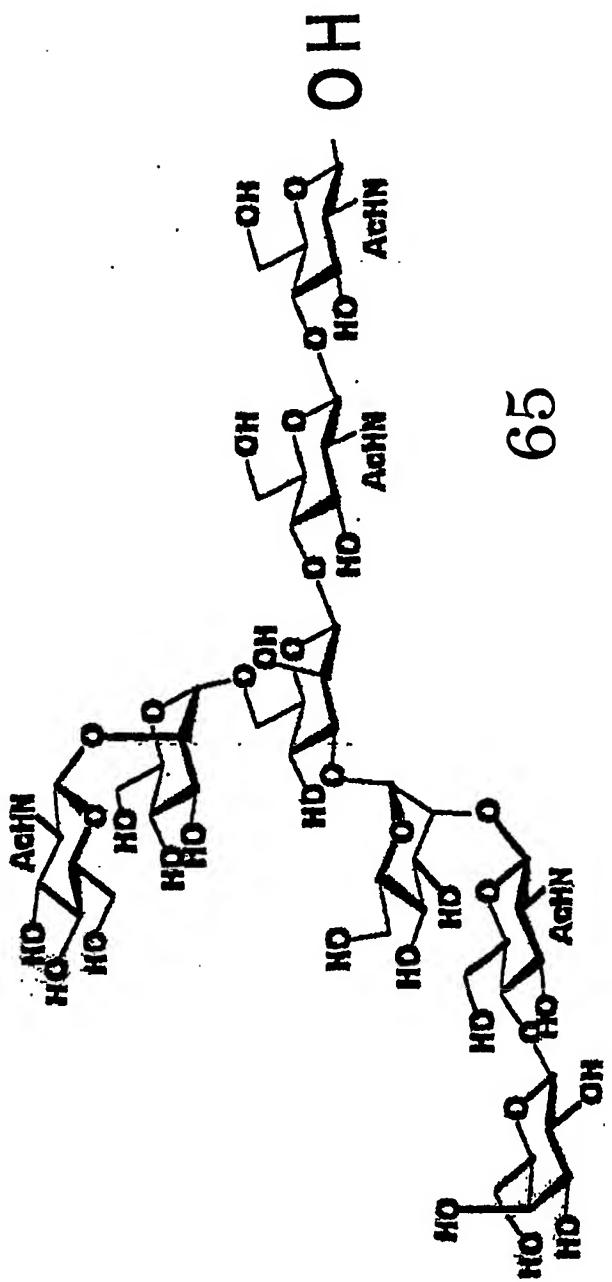
第5図

5/6/12



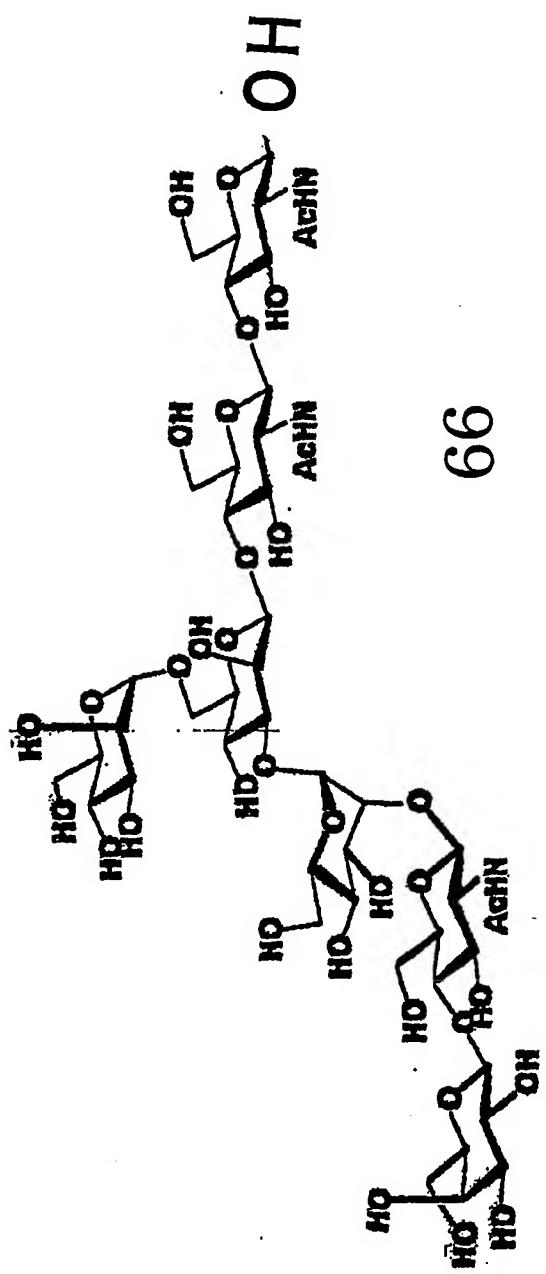
第5図

5/7/12



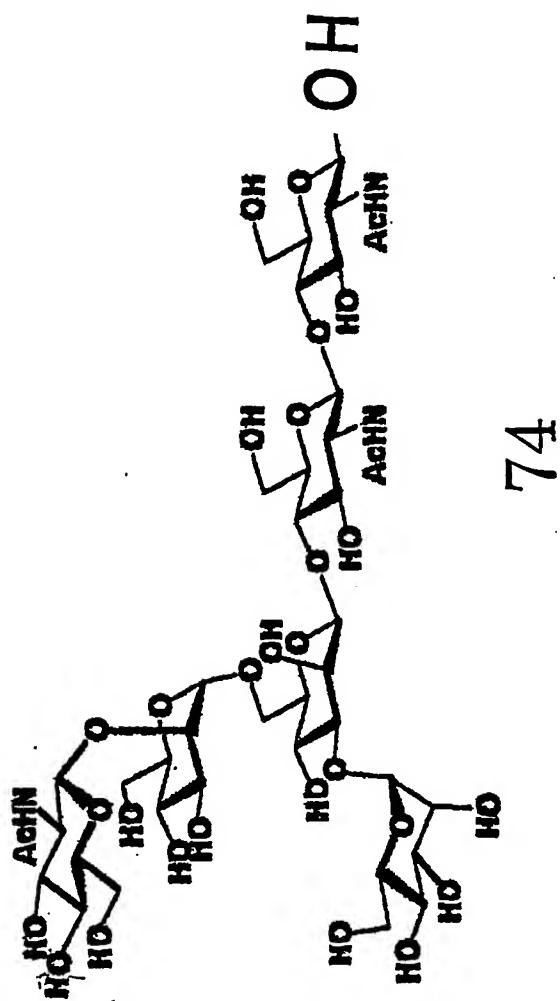
第5図

5/8/12



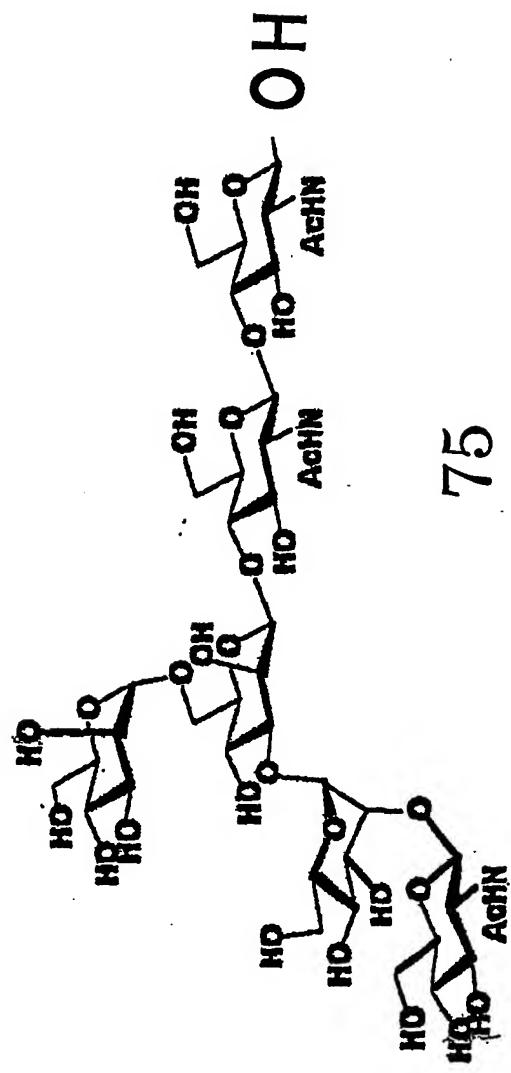
第5図

5/9/12



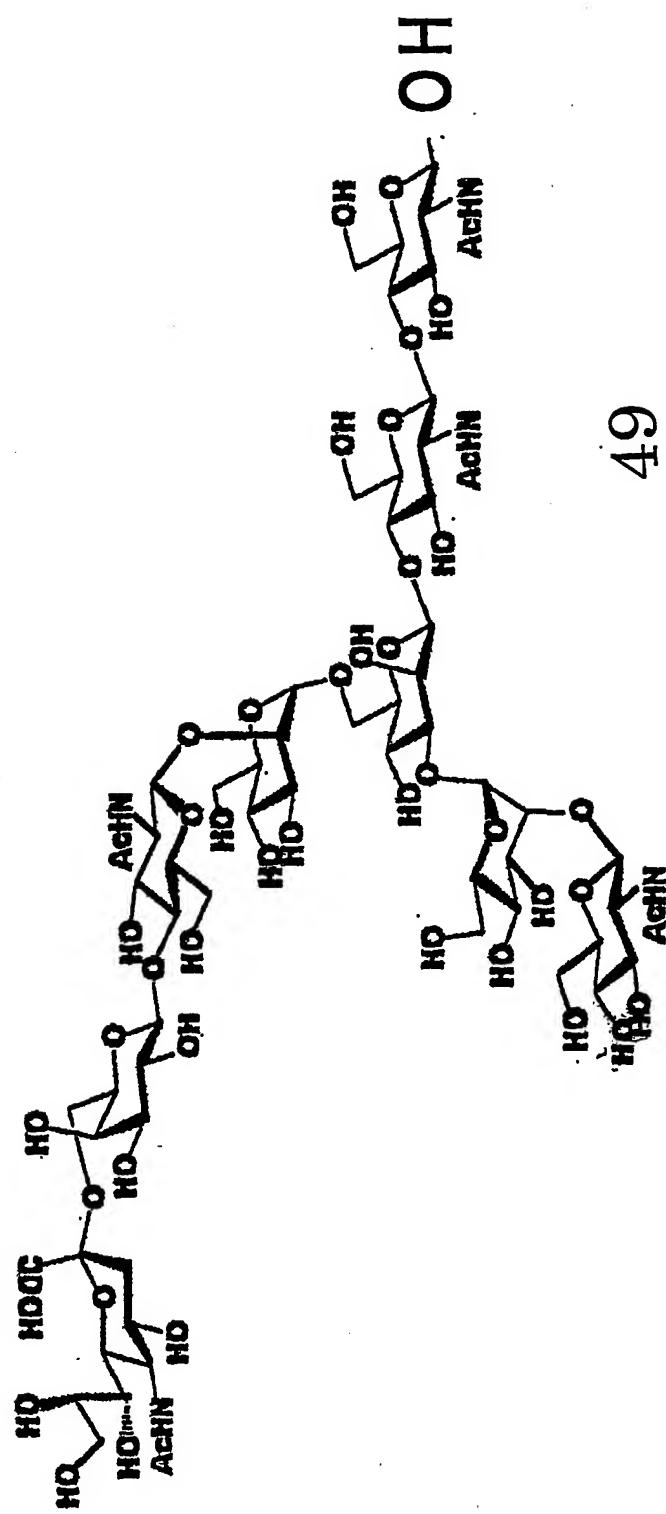
第5図

5/10/12

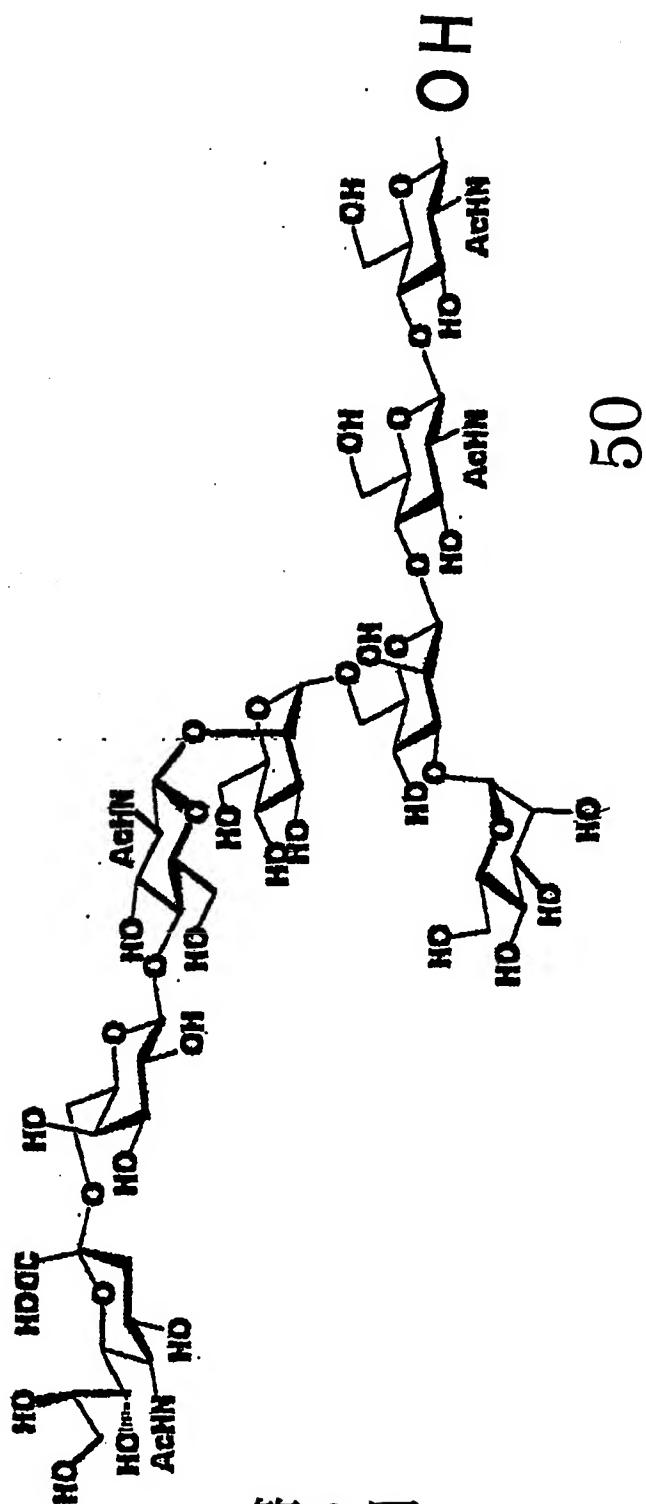


第5図

5/11/12

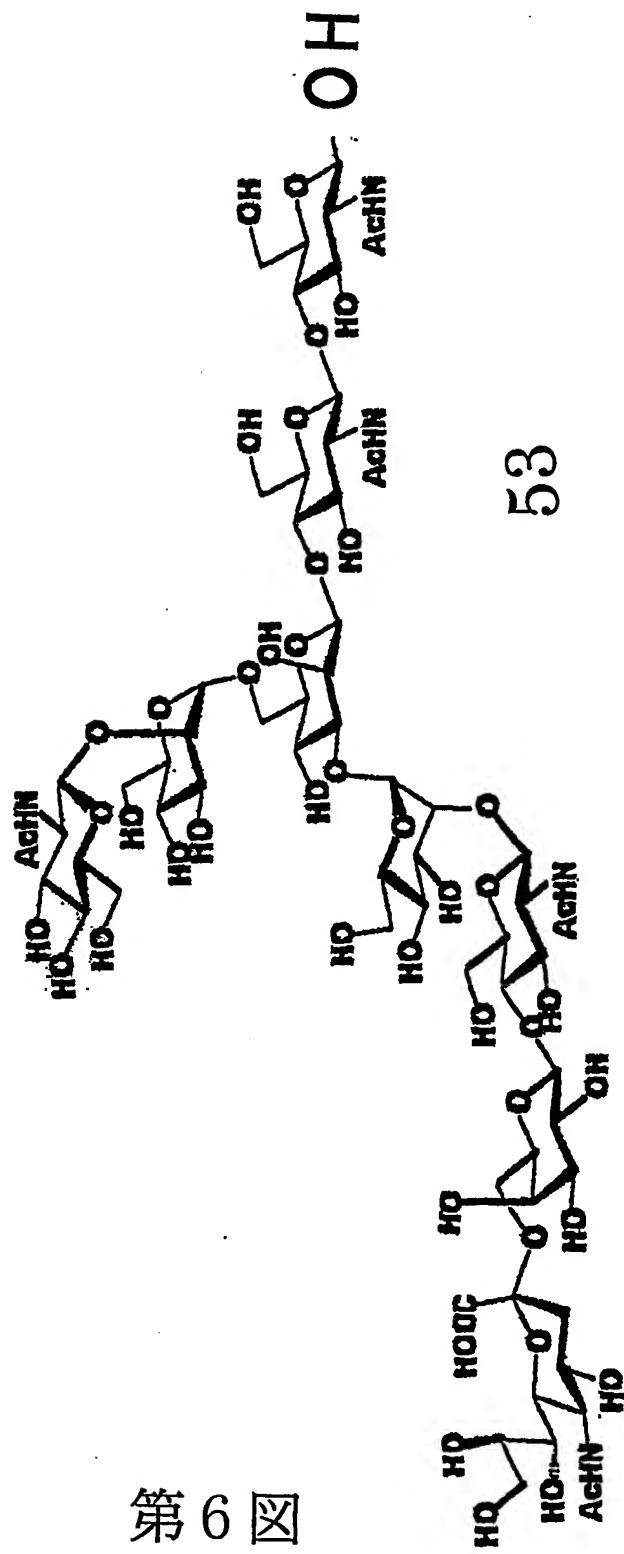


第6図



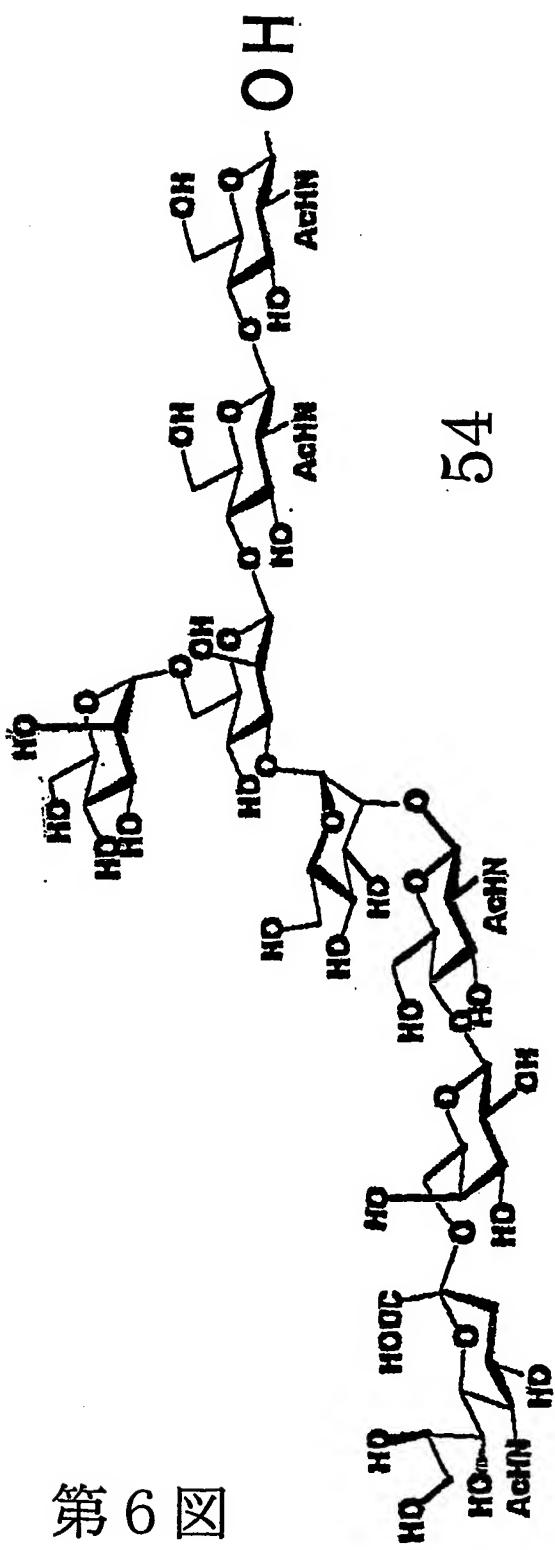
第6図

6/1/12



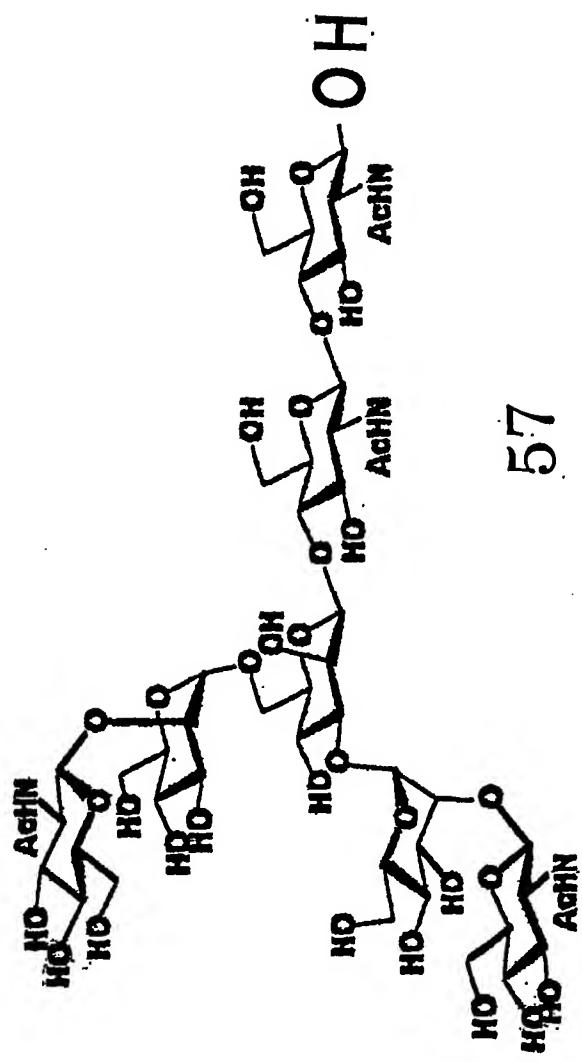
第6図

6/2/12



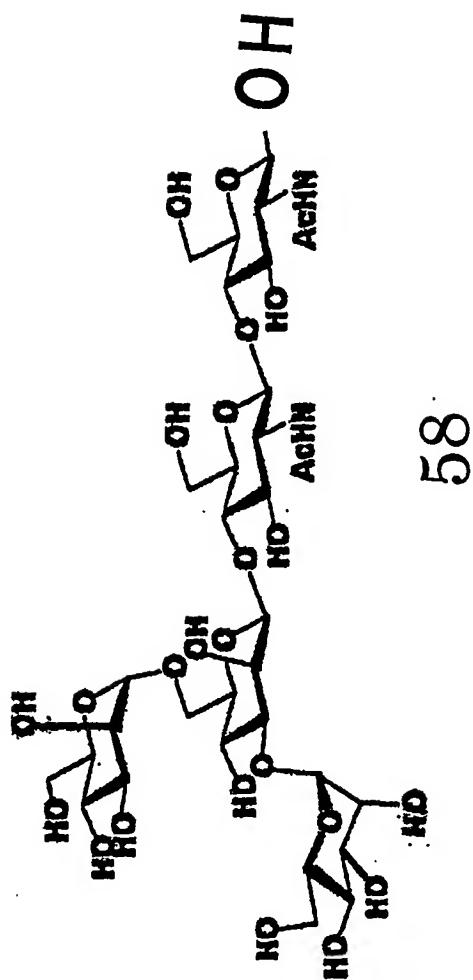
第 6 図

6/3/12

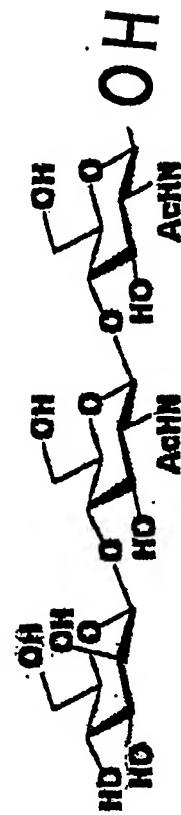


第6図

6/4/12



第6図

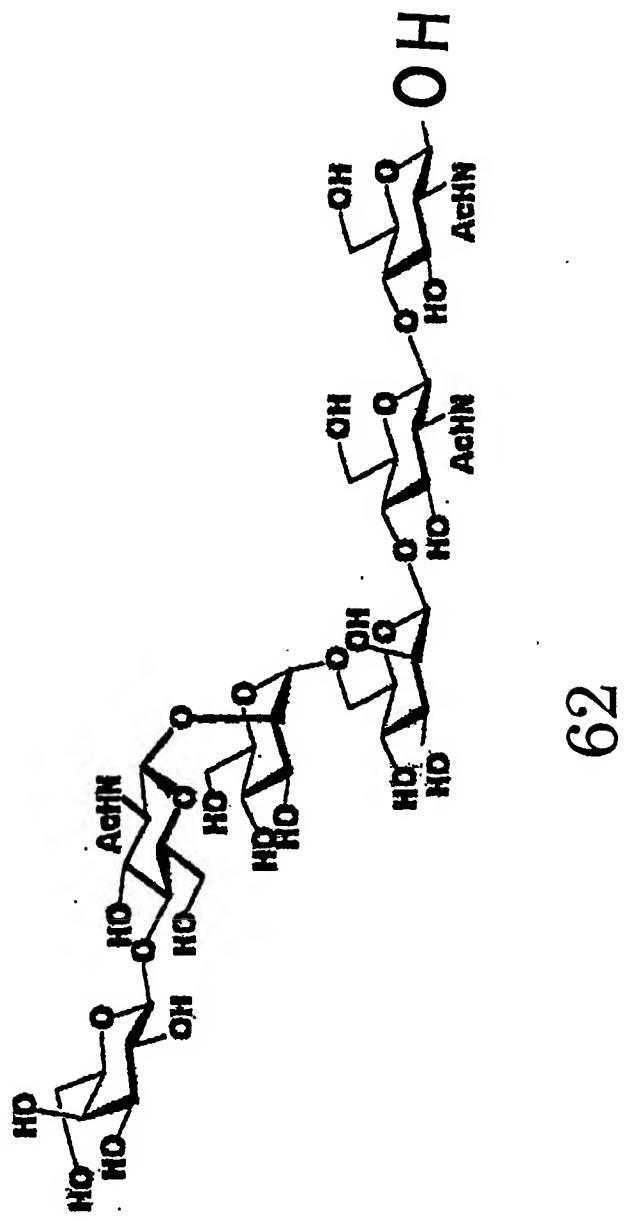


59

第6図

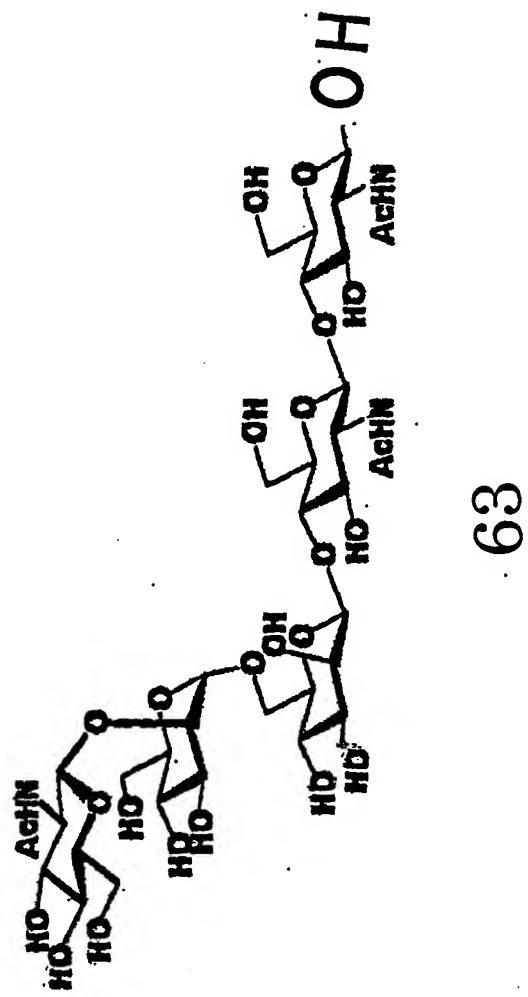
6/6/12

差替え用紙(規則26)



第6図

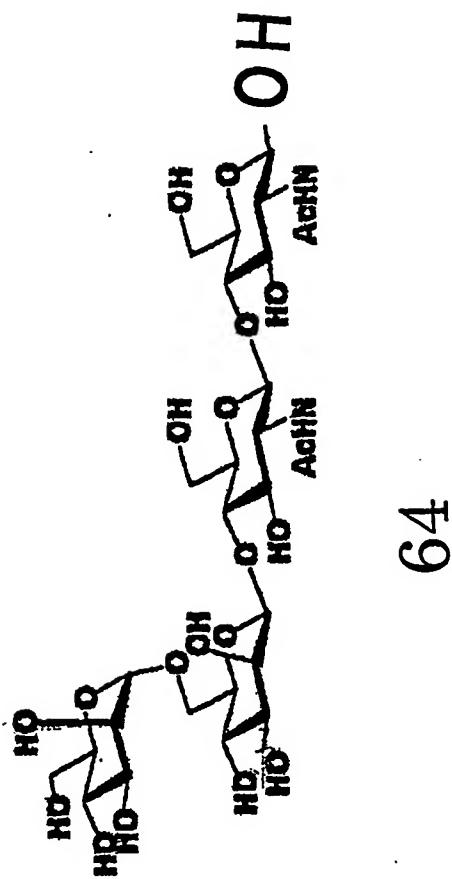
6/7/12



第6図

6/8/12

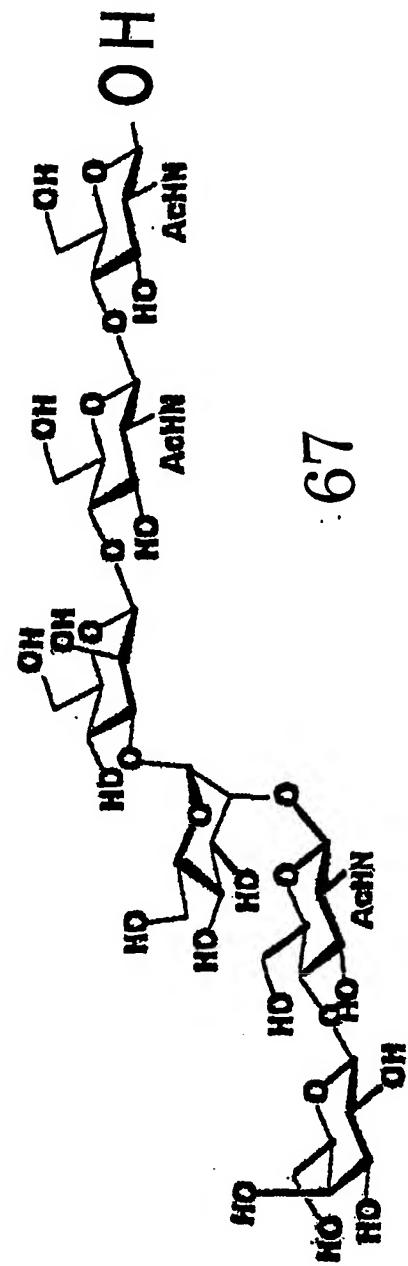
差替え用紙(規則26)



第6図

6/9/12

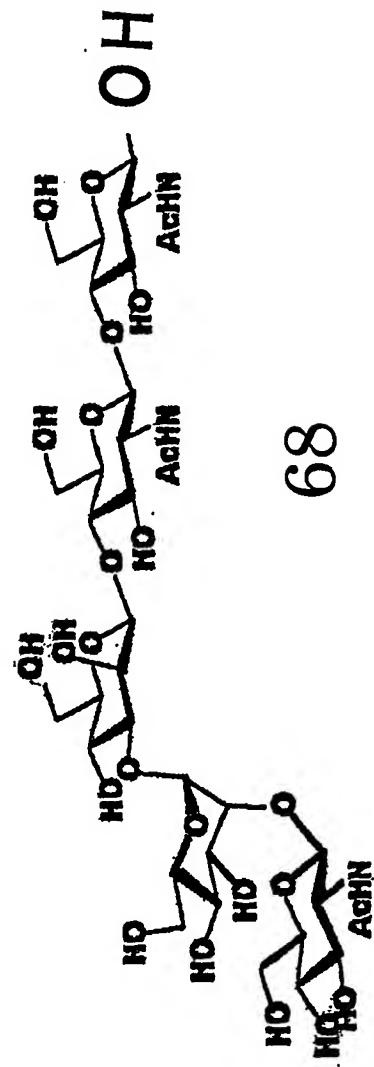
差替え用紙(規則26)



第6図

6/10/12

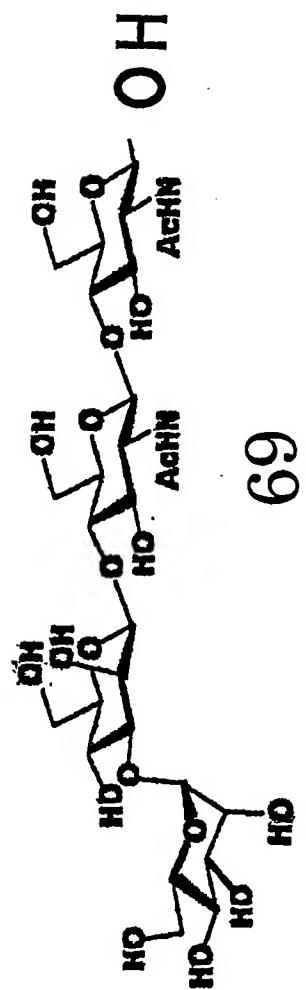
差替え用紙(規則26)



第6図

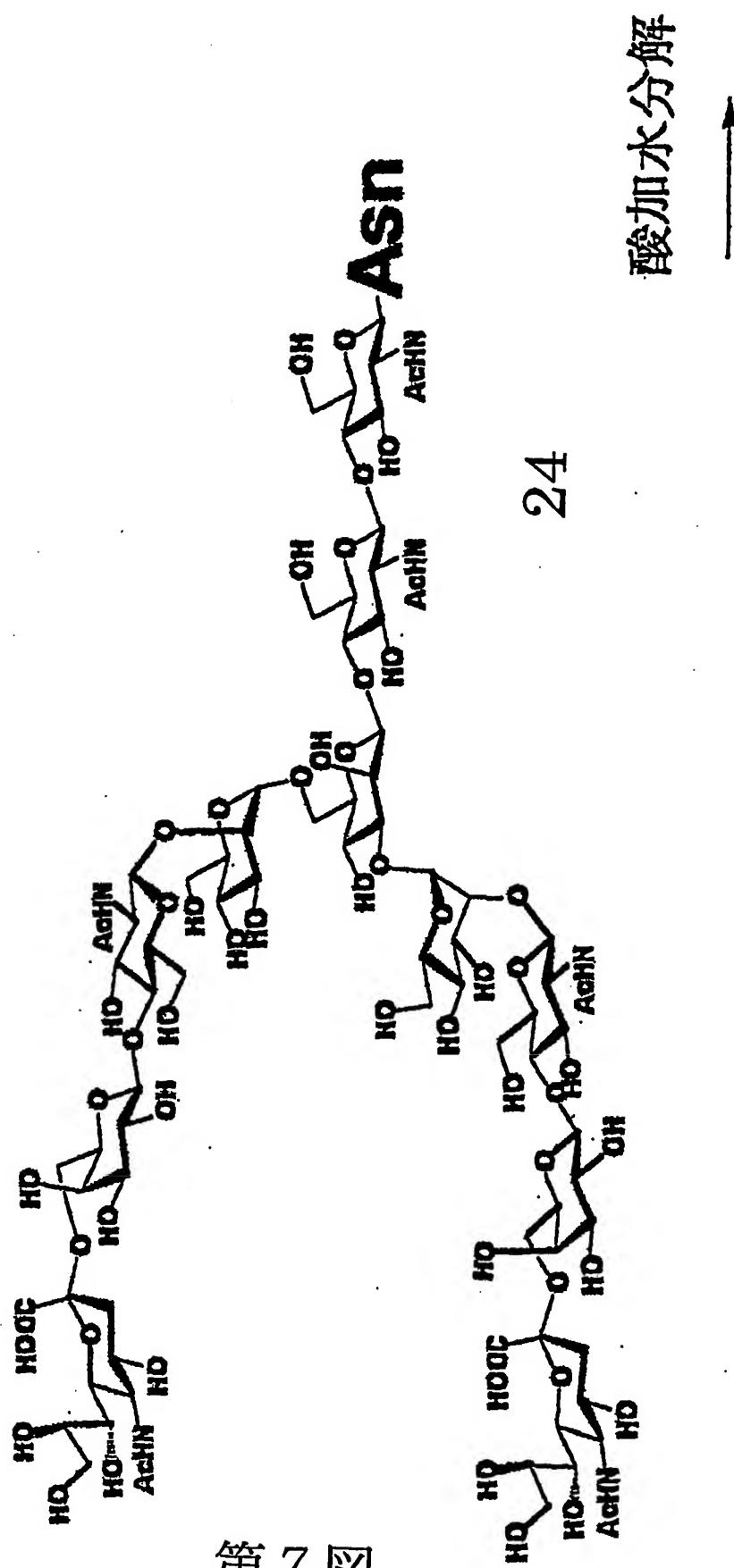
6/11/12

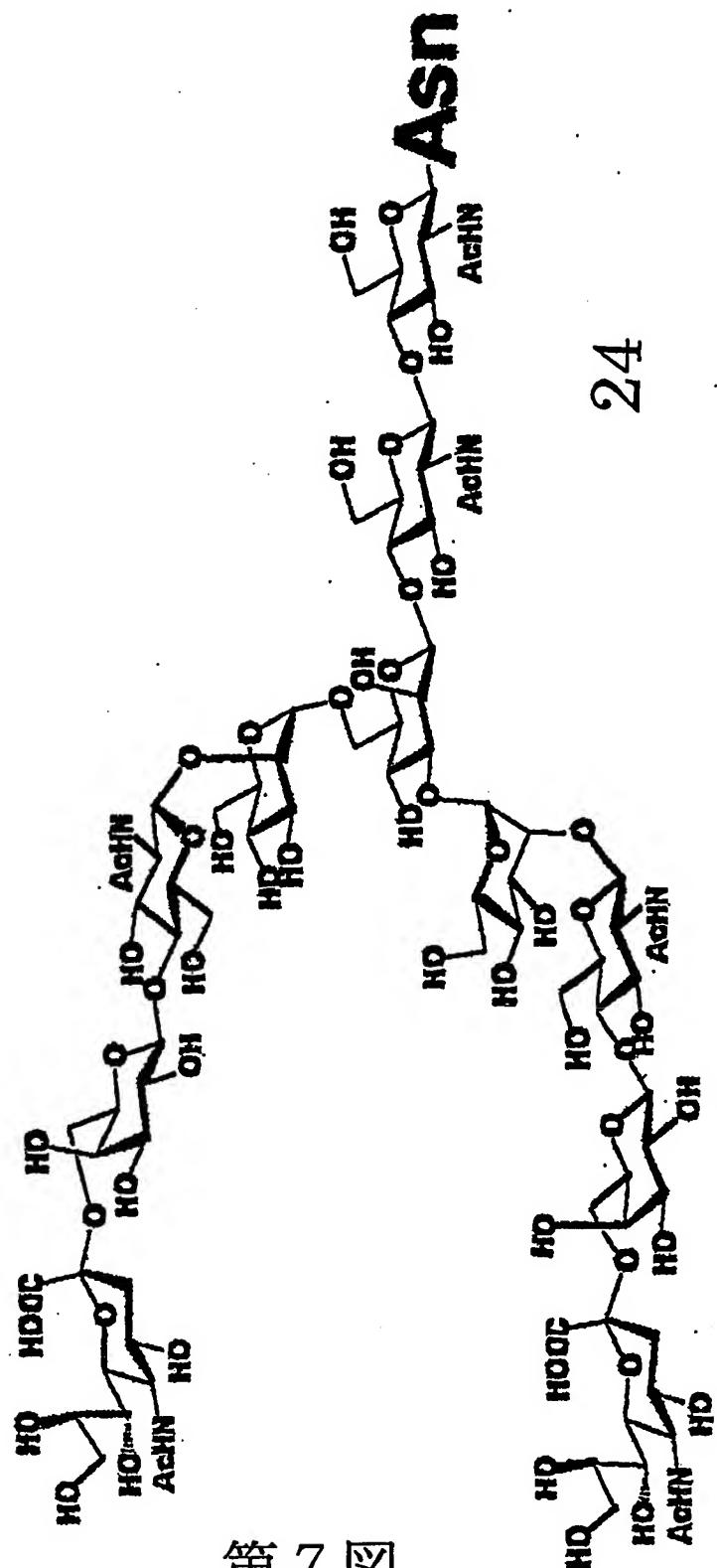
差替え用紙(規則26)



第6図

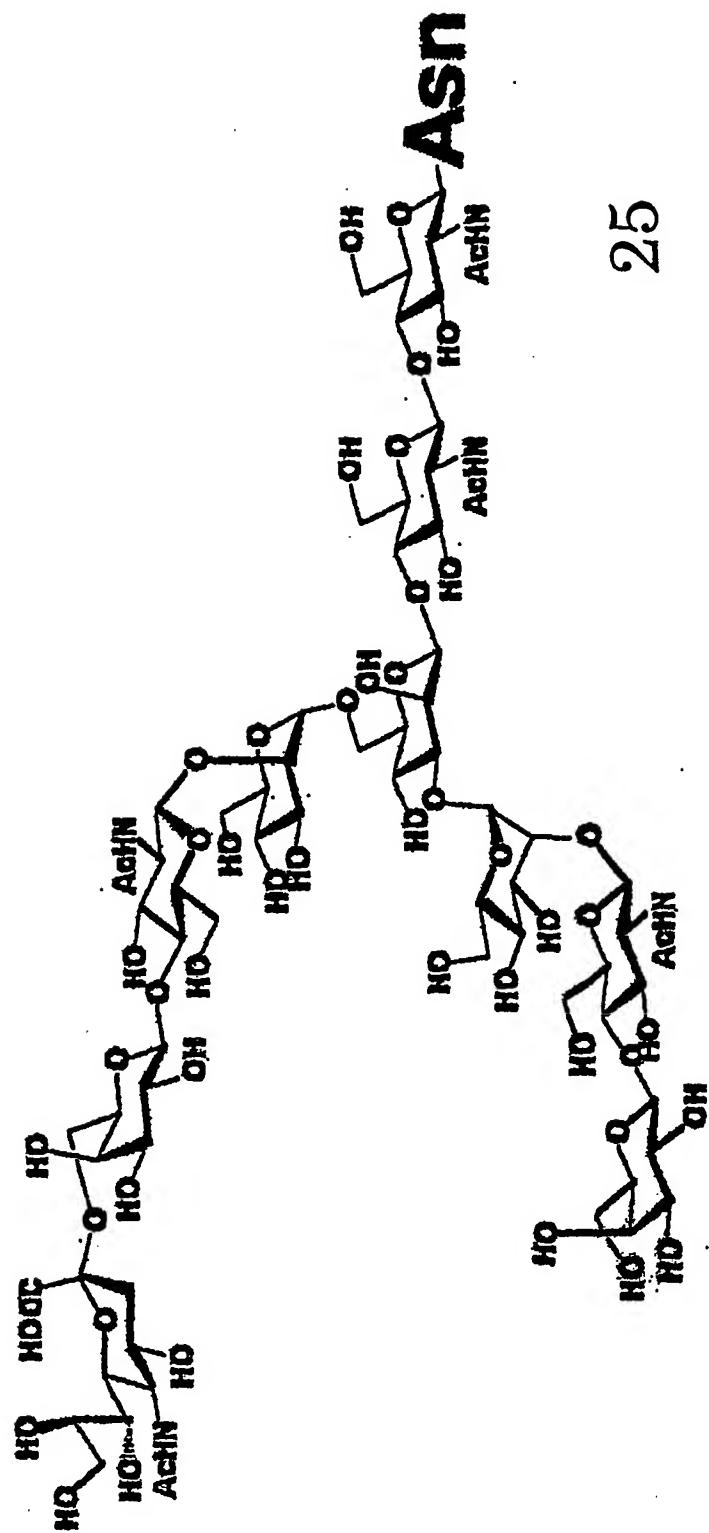
6/12/12





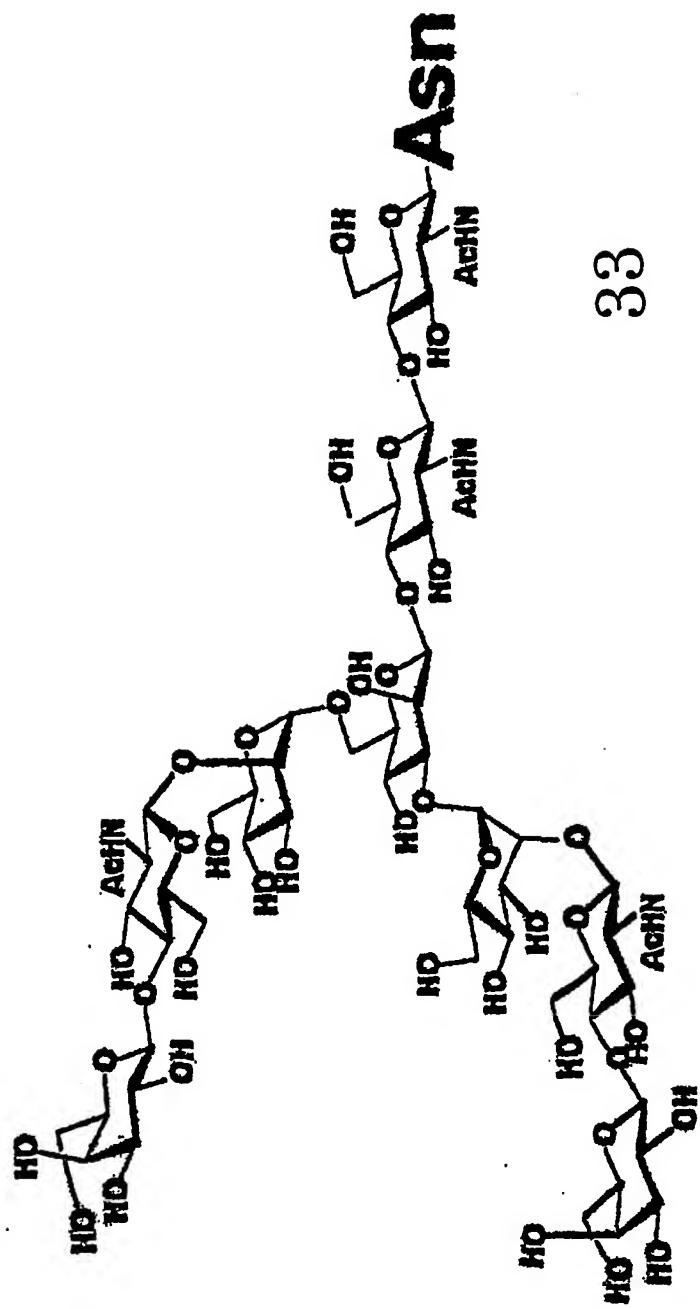
第7図

7/1/12



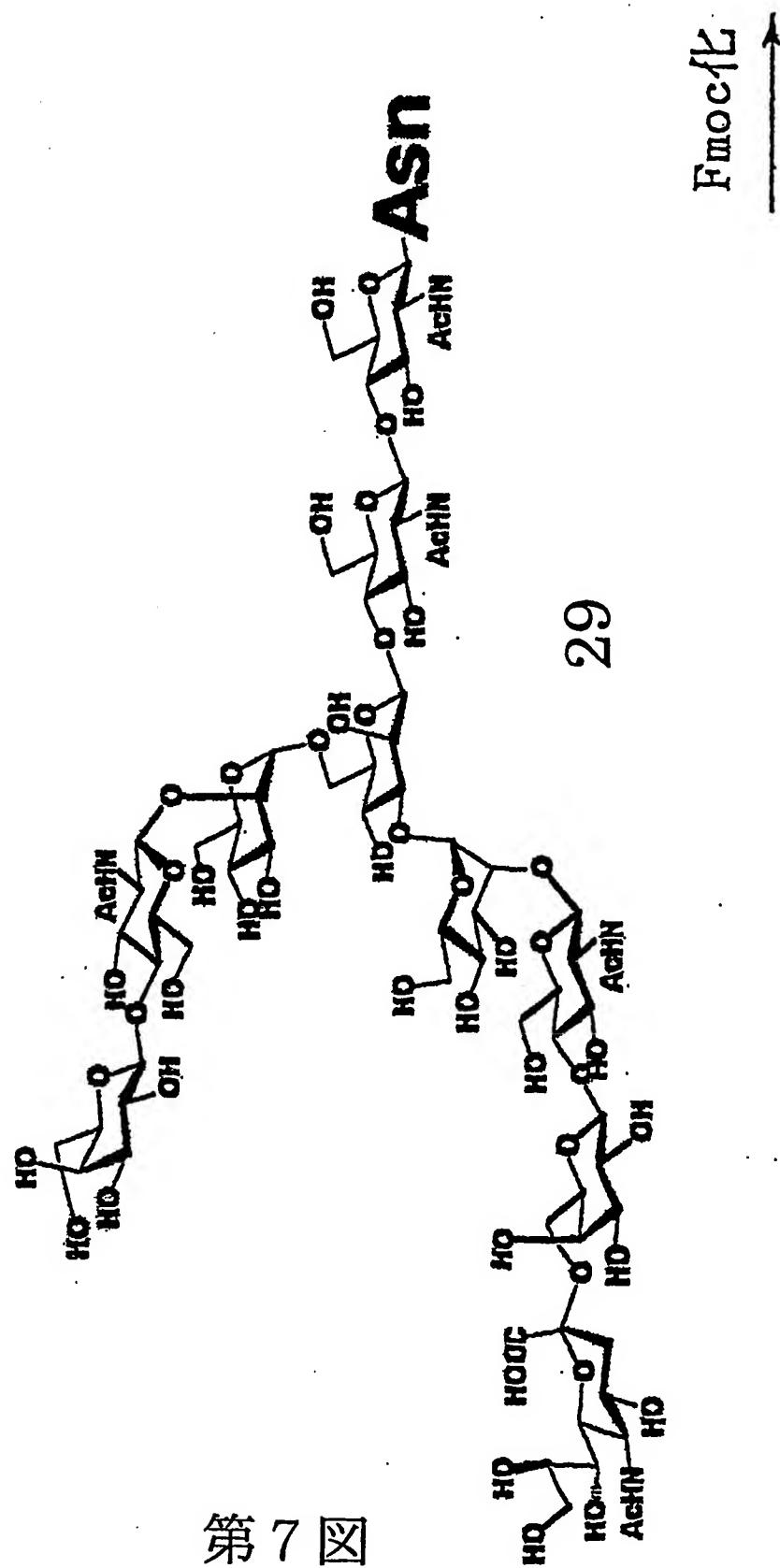
第7図

7/2/12



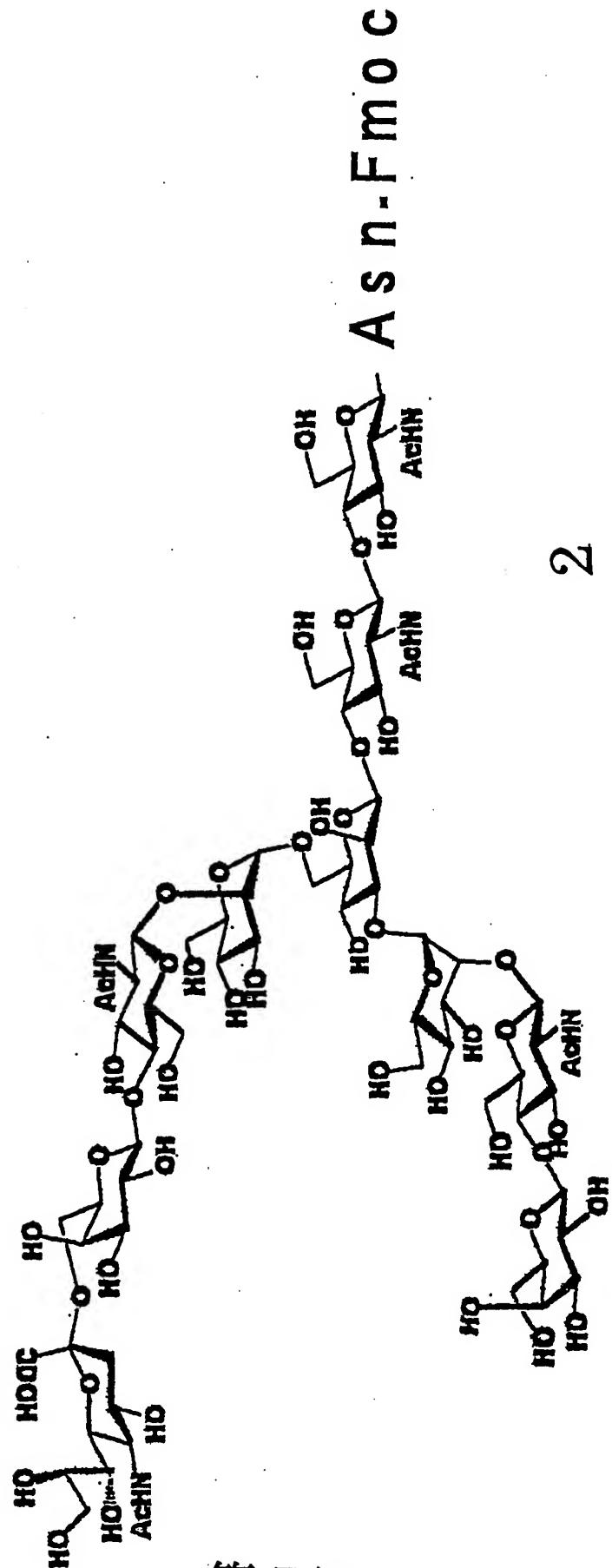
第7図

7/3/12



第7図

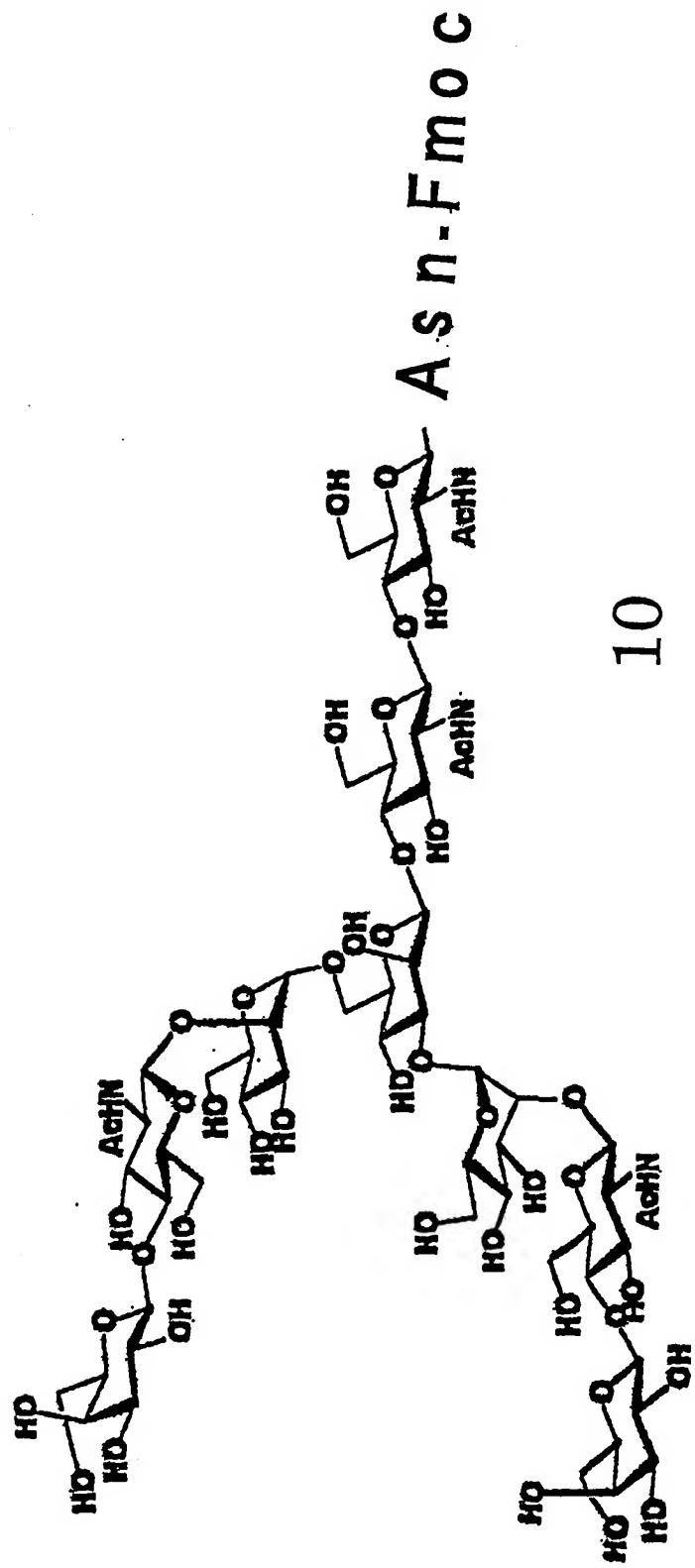
7/4/12



第7図

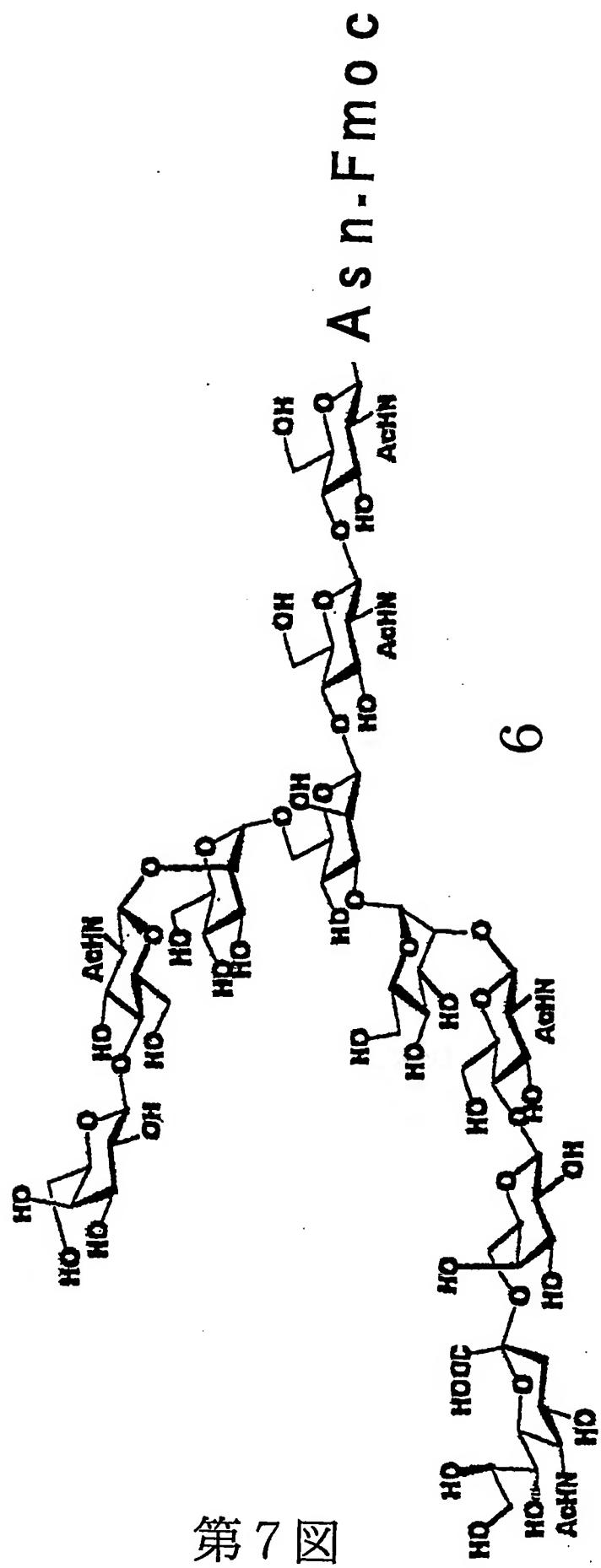
7/5/12

差替え用紙(規則26)



第7回

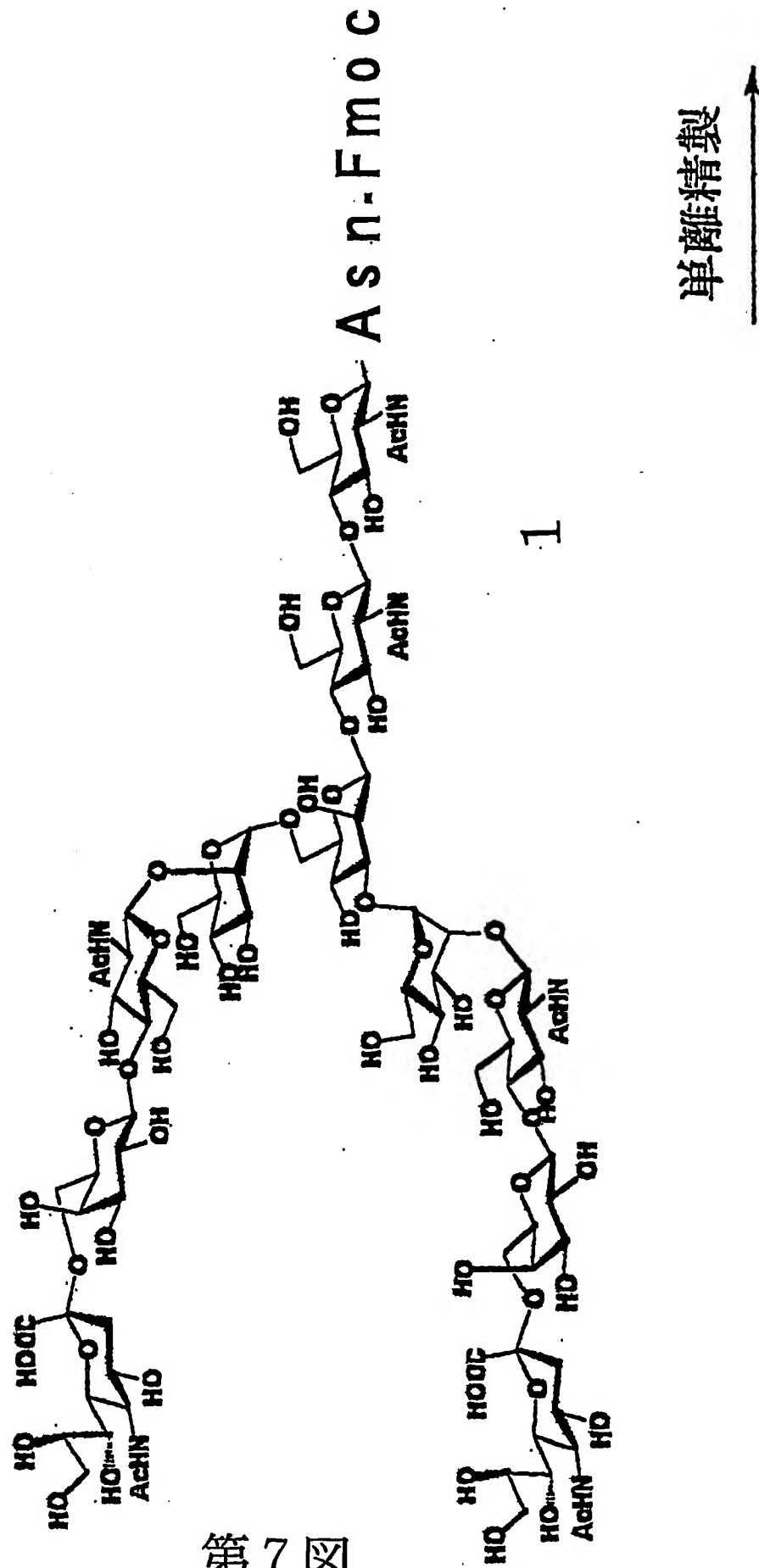
7/6/12

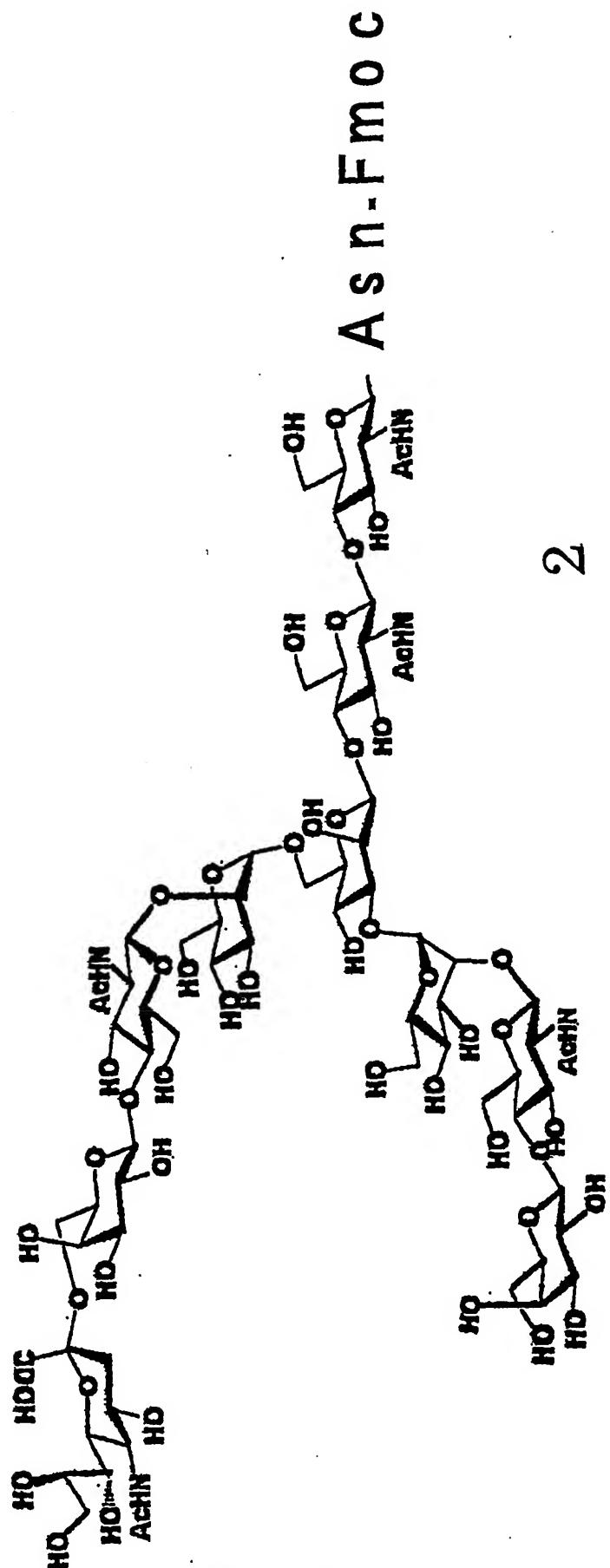


第7図

7/7/12

· 差替え用紙 (規則26)

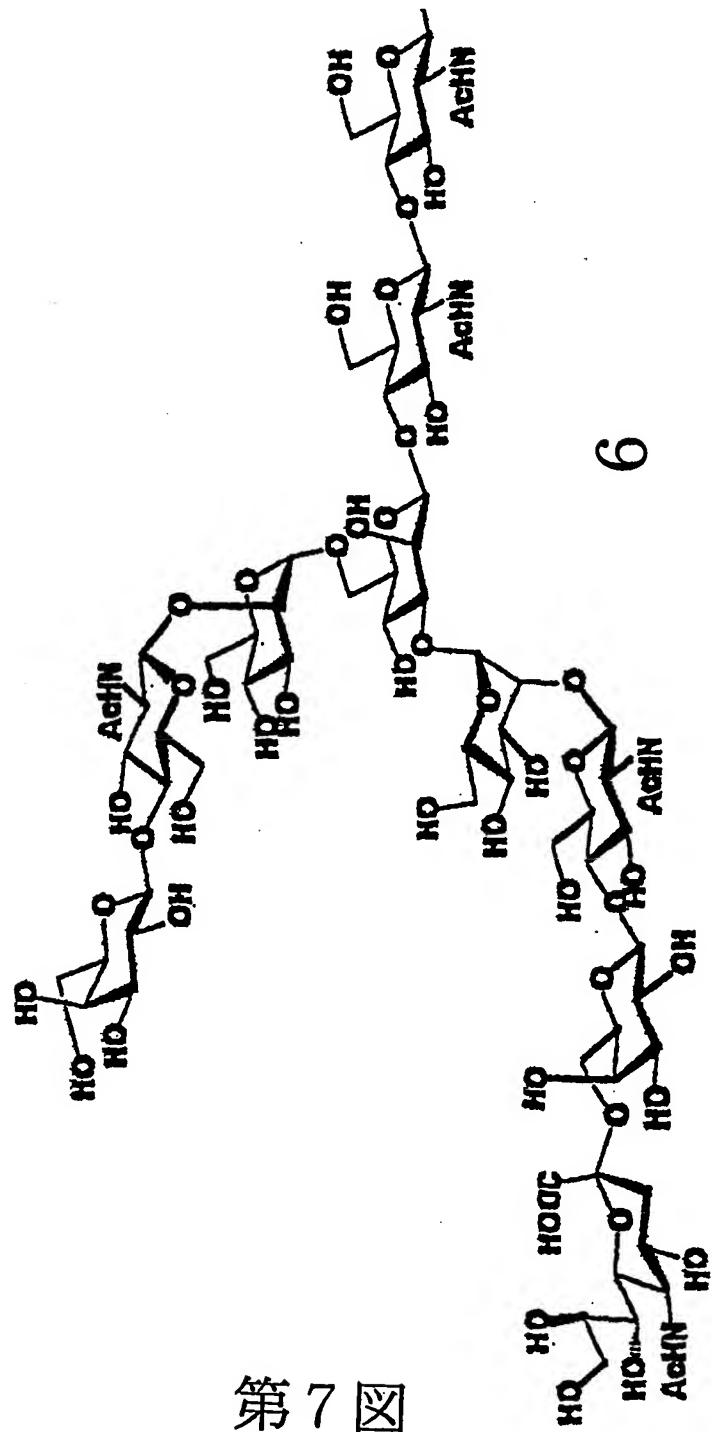




第7図

7/9/12

A s n - F m o c

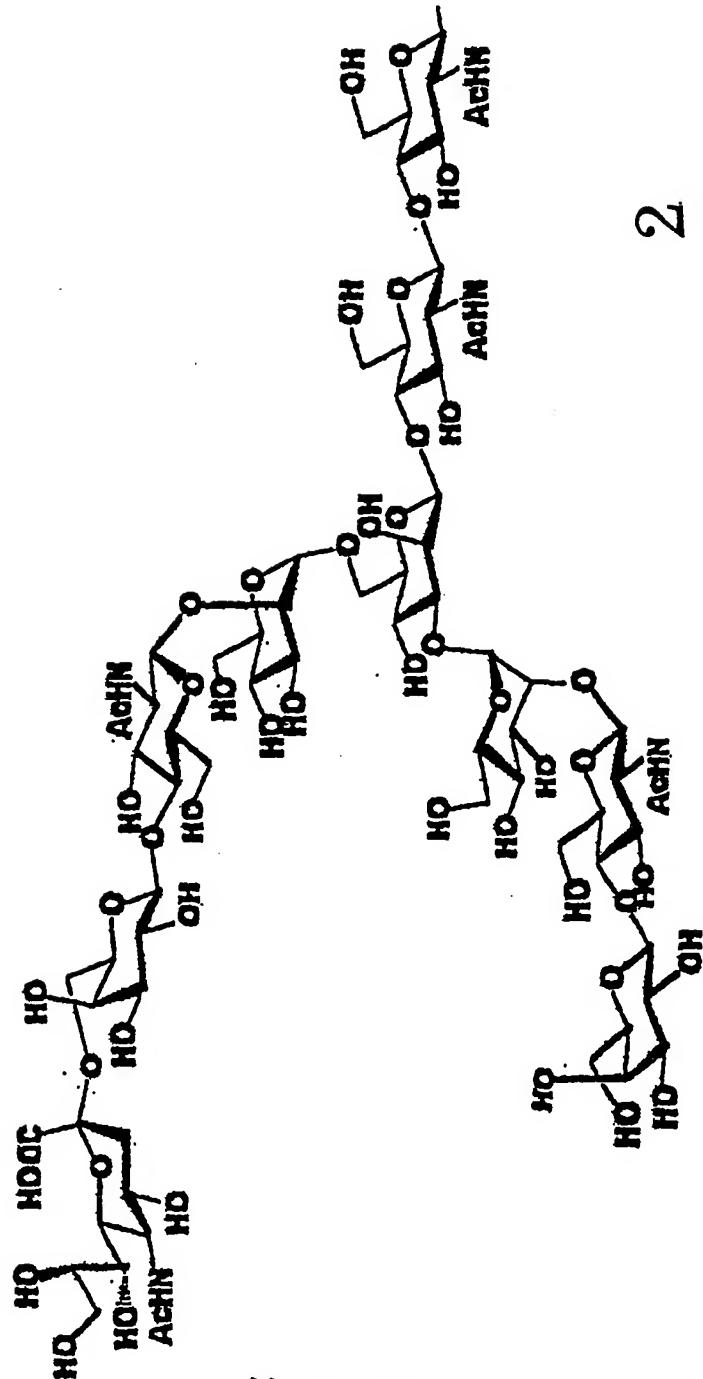


第7図

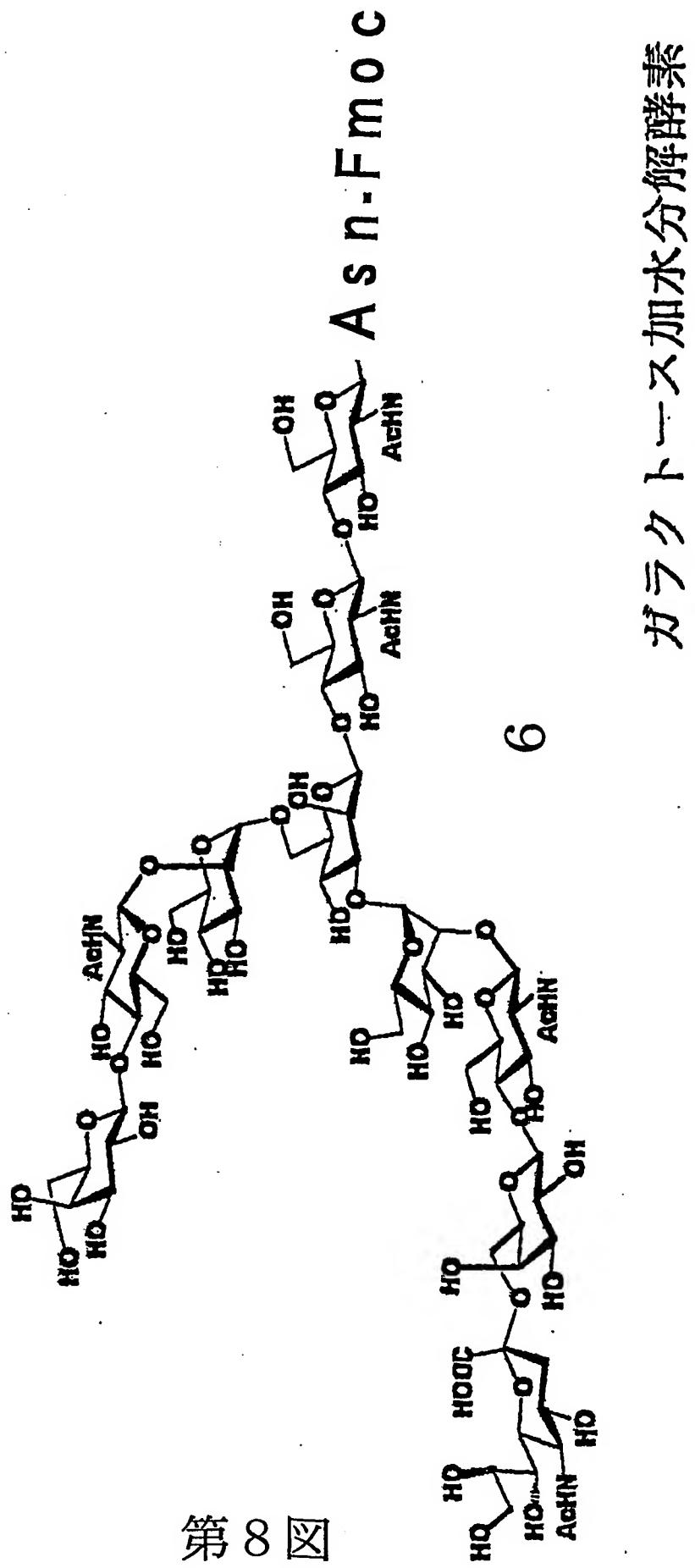
7/10/12

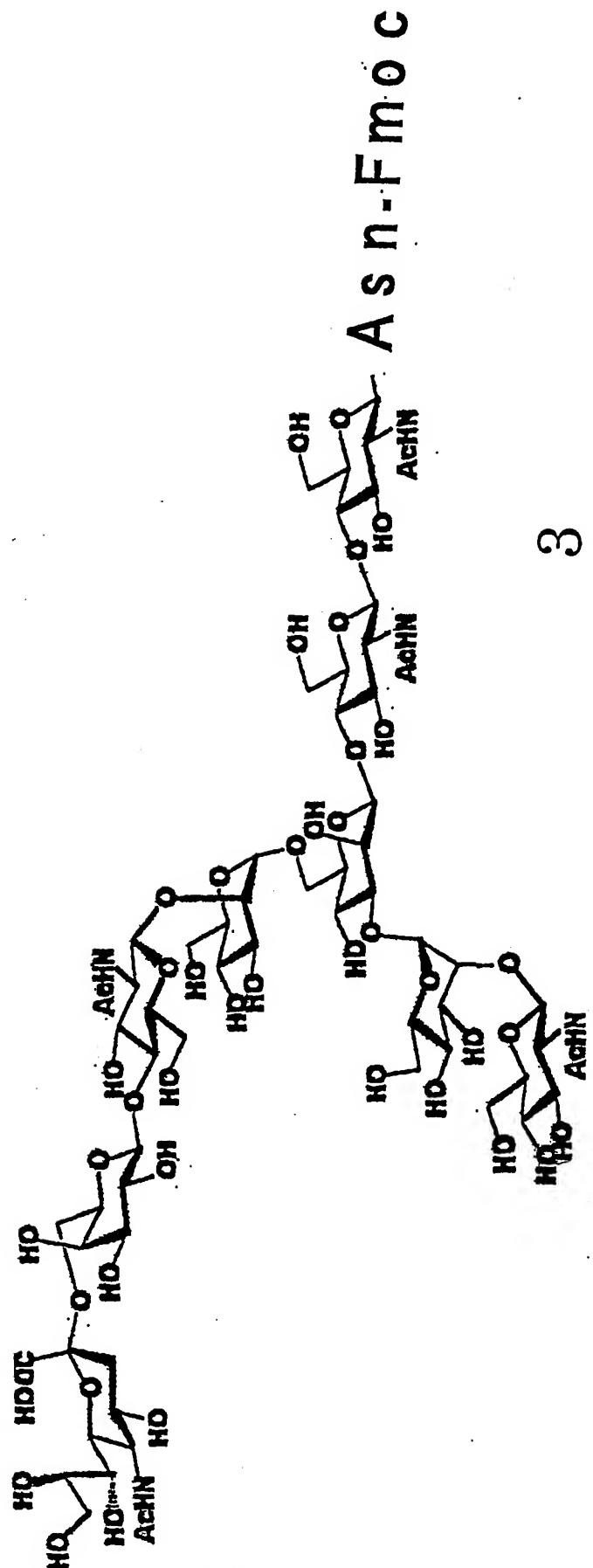
A s n - F m o c

2



第8図

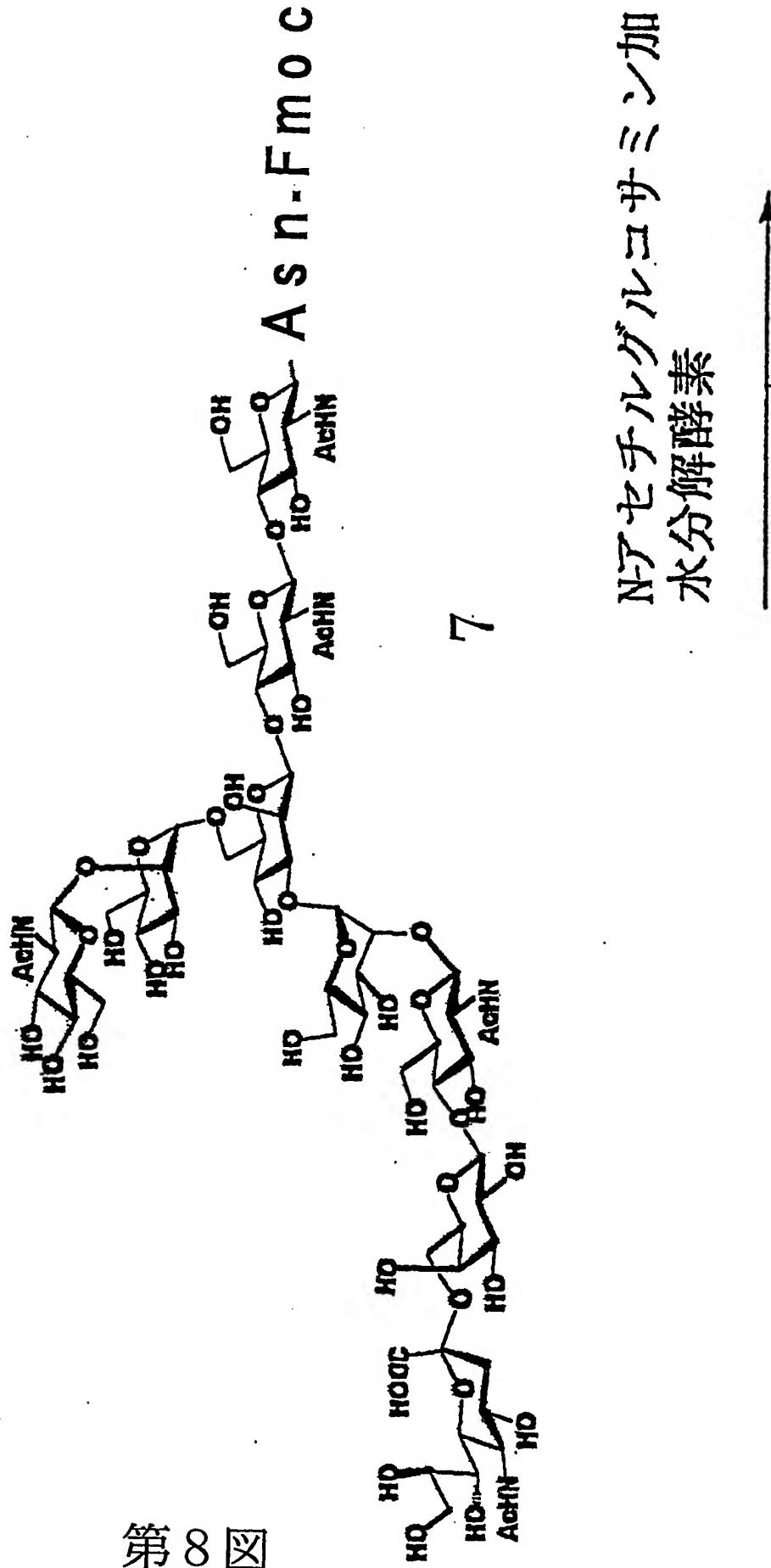




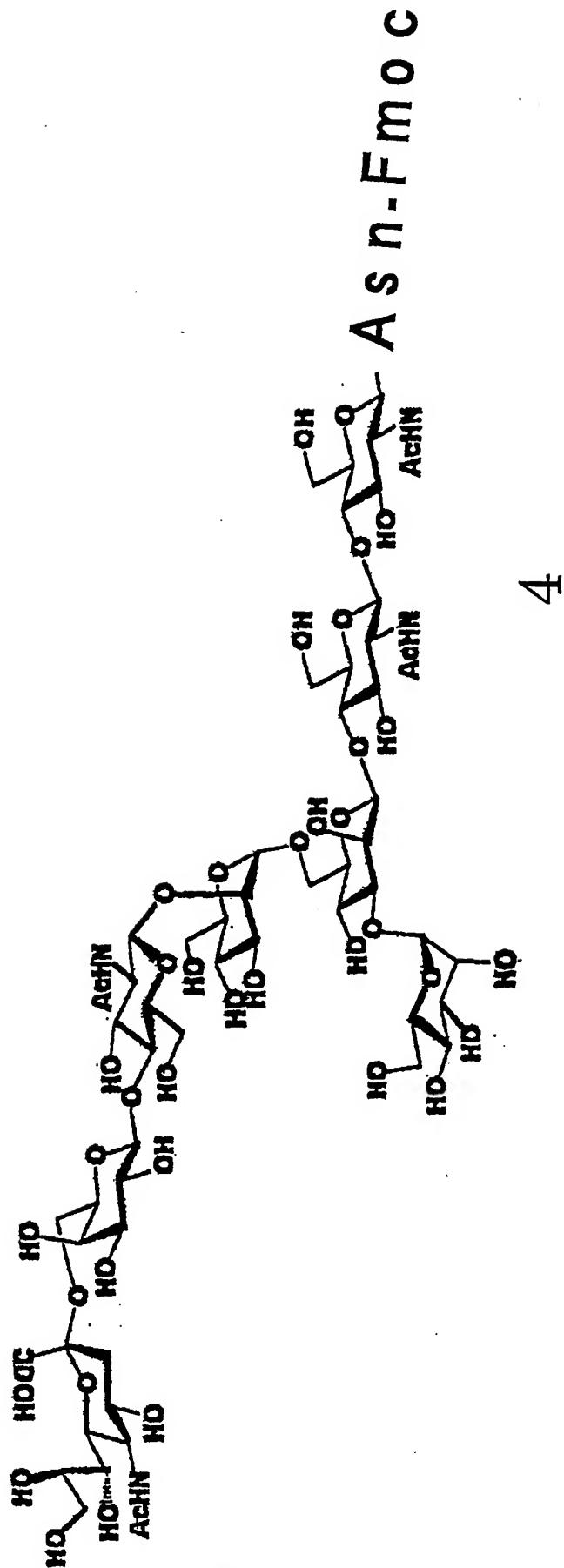
第8図

8/2/12

差替文用紙(規則26)

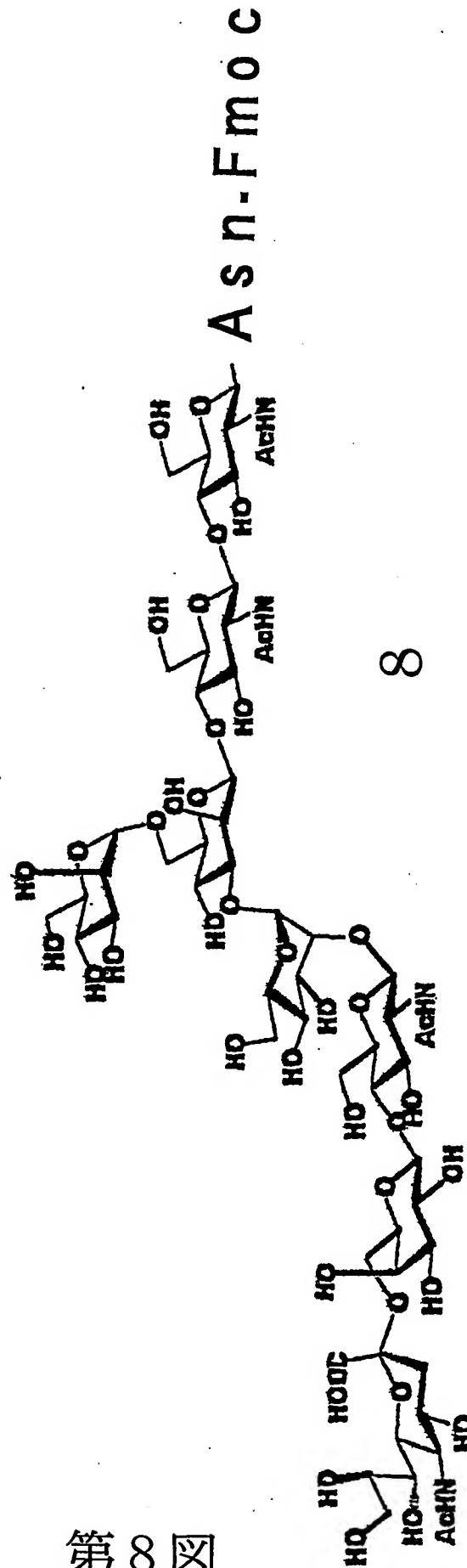


第8回



第8図

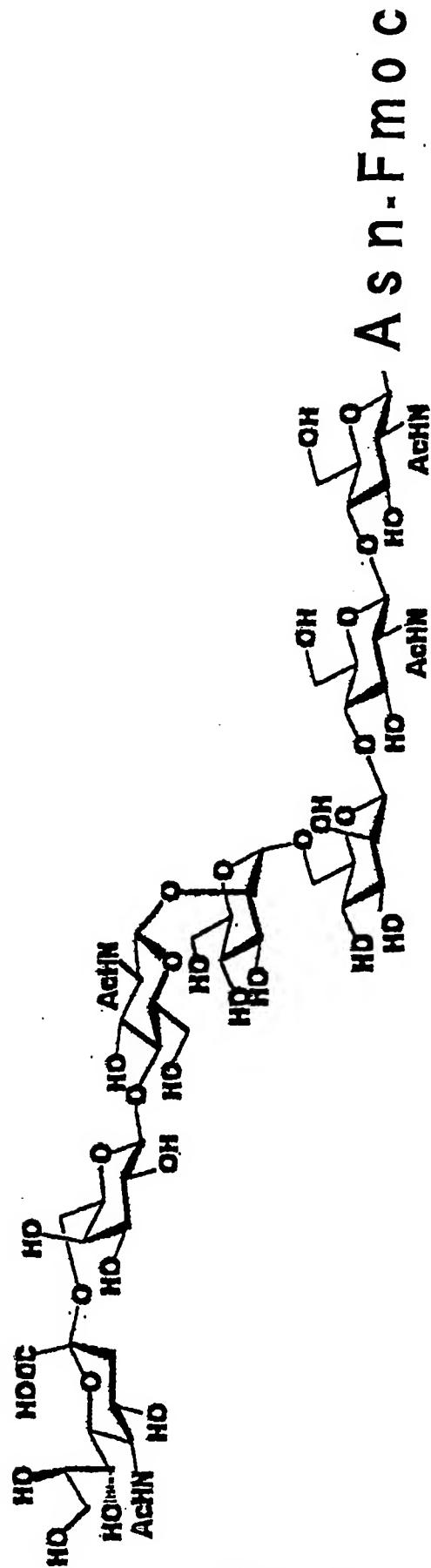
8/4/12



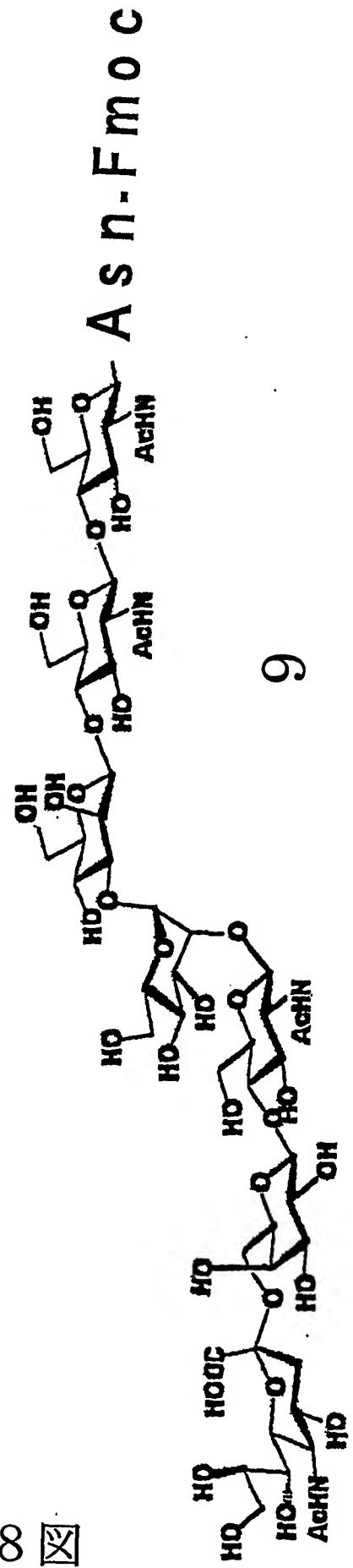
第8図

8/5/12

差替え用紙(規則26)



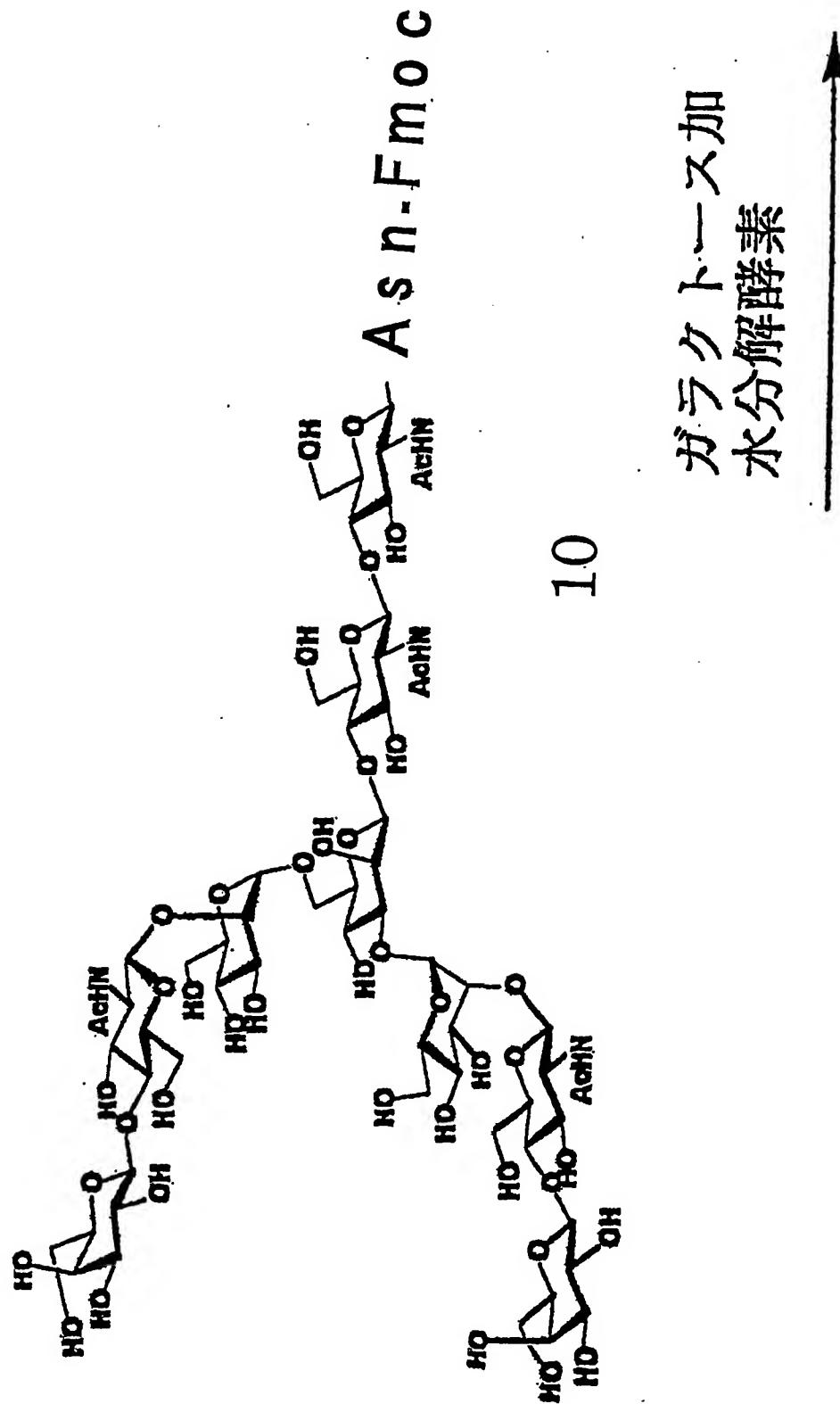
第8図



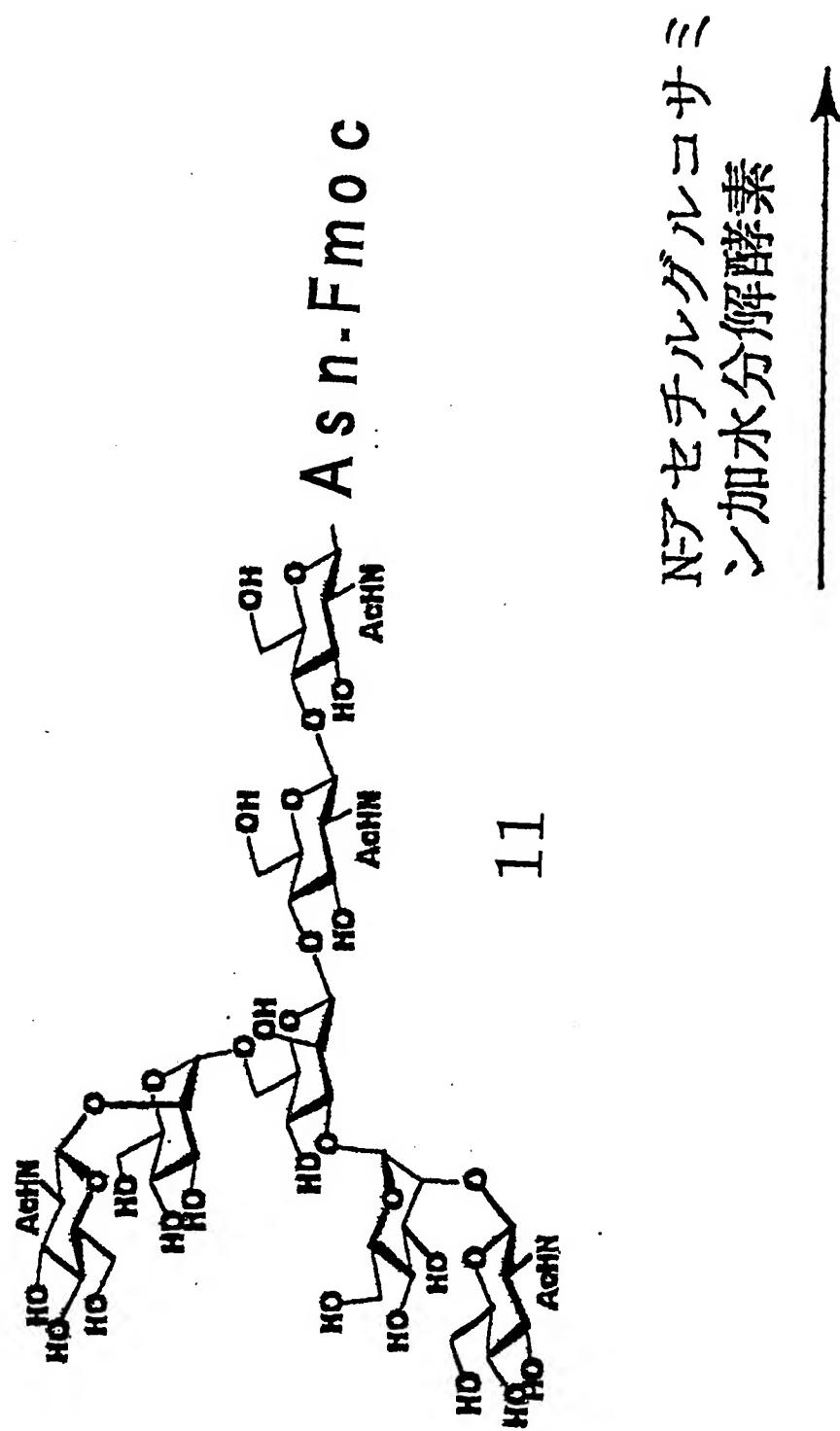
第8図

8/7/12

差替え用紙(規則26)

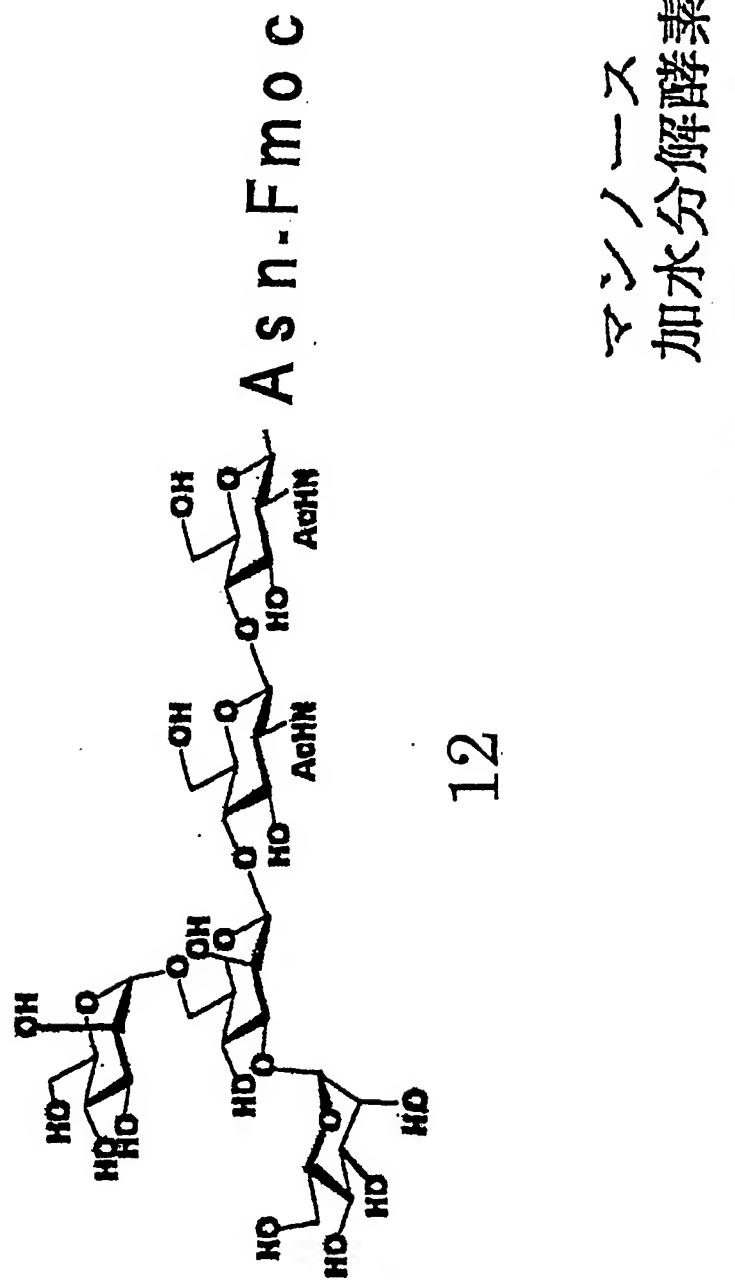


第9図



第9図

9/1/12



第9図

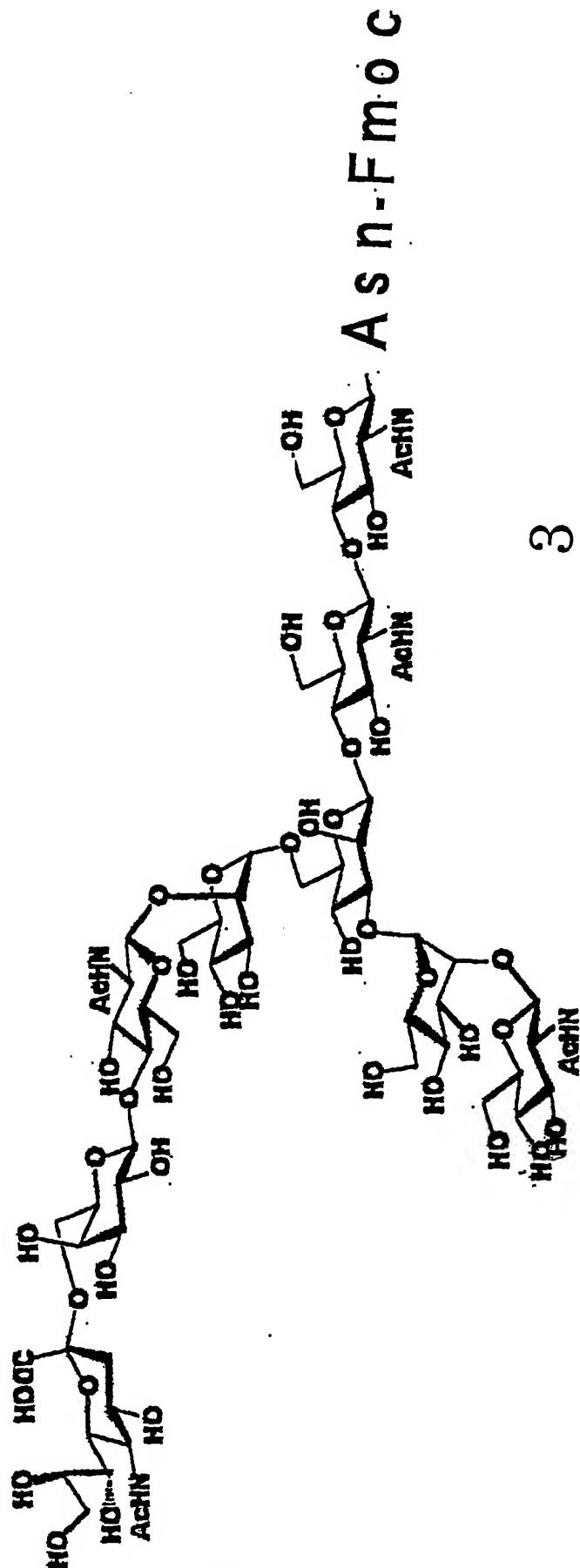
9/2/12



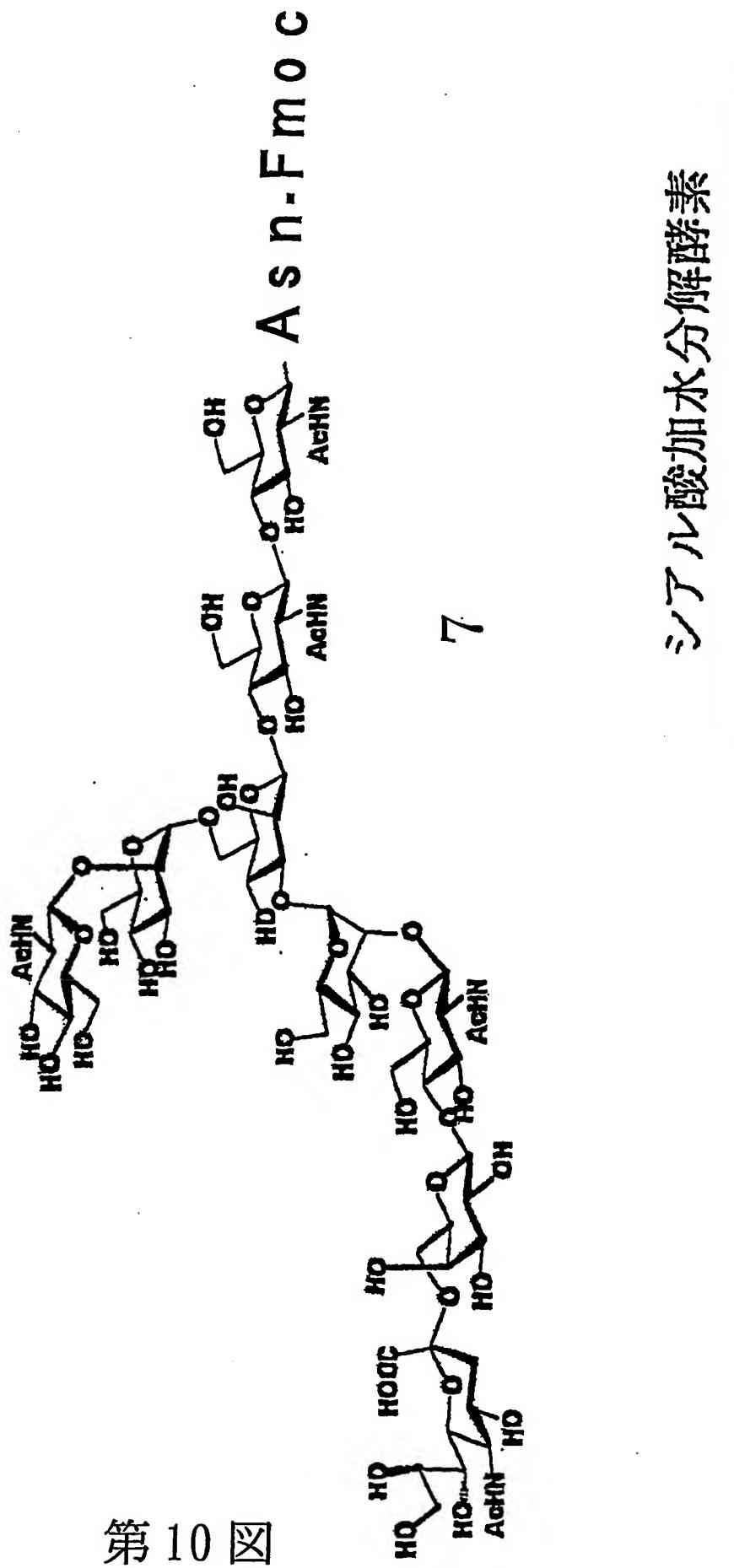
13

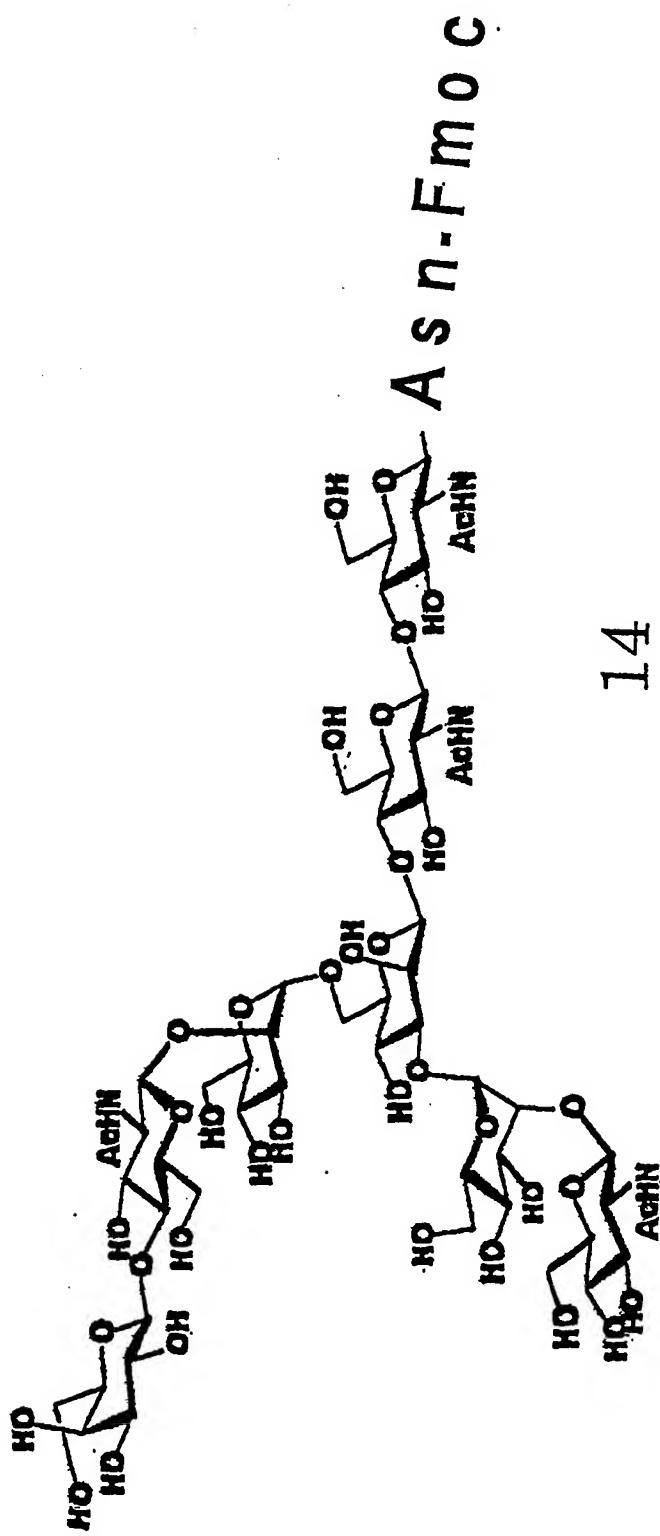
第9図

9/3/12



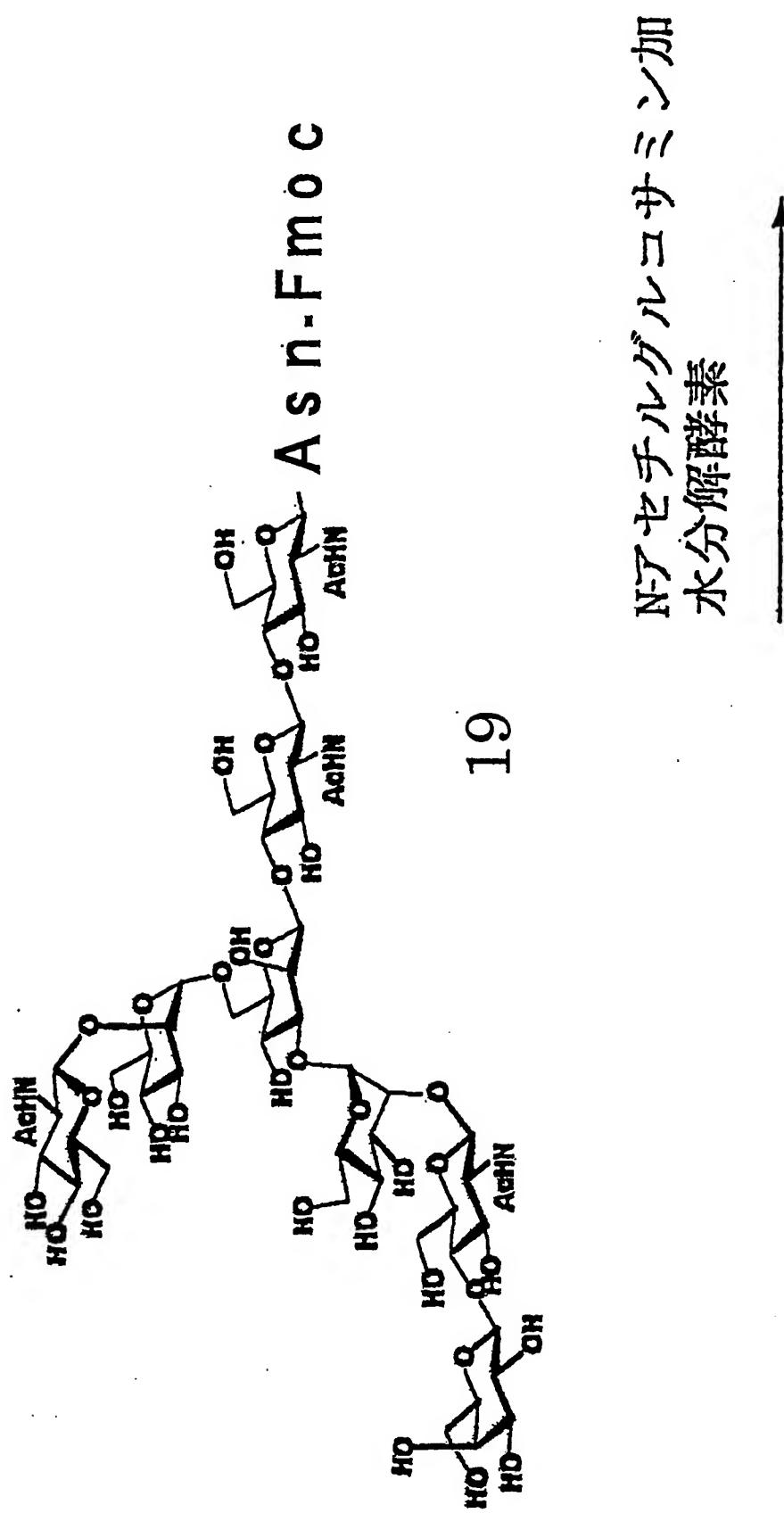
第10図





第 10 図

10/2/12

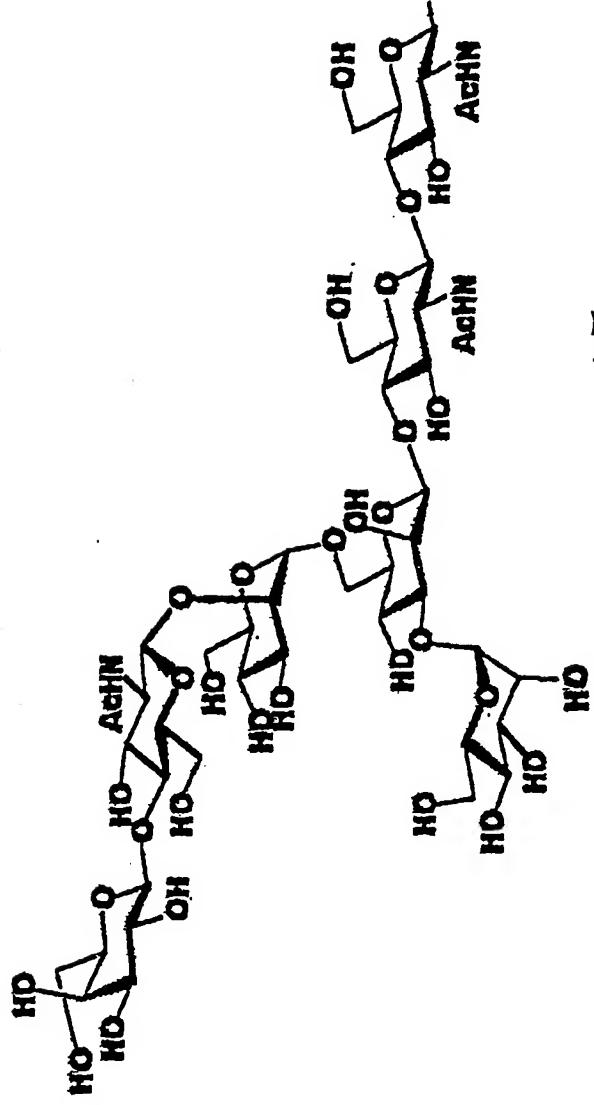


第10図

10/3/12

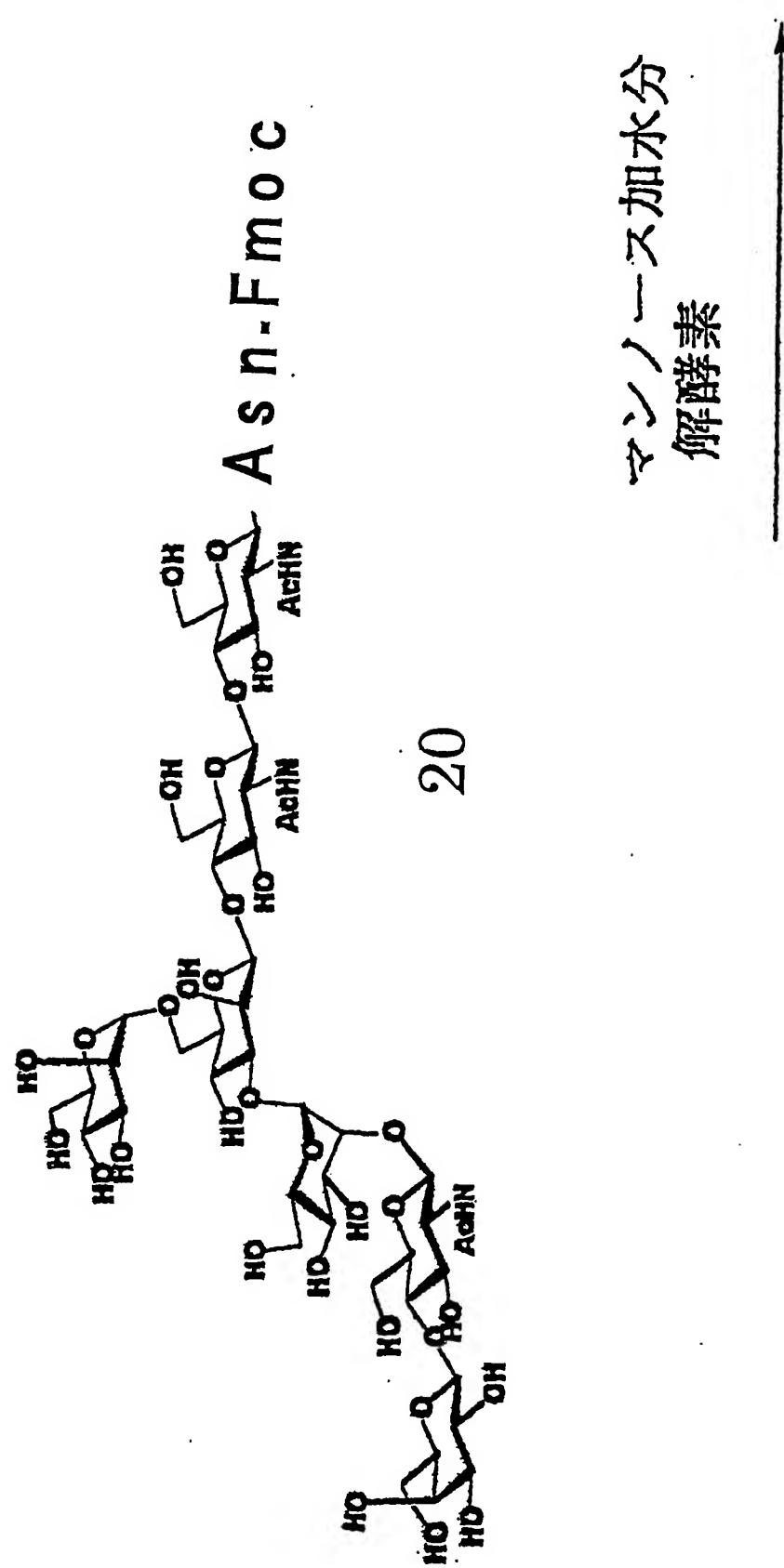
Asn-Fmoc

15



第10回

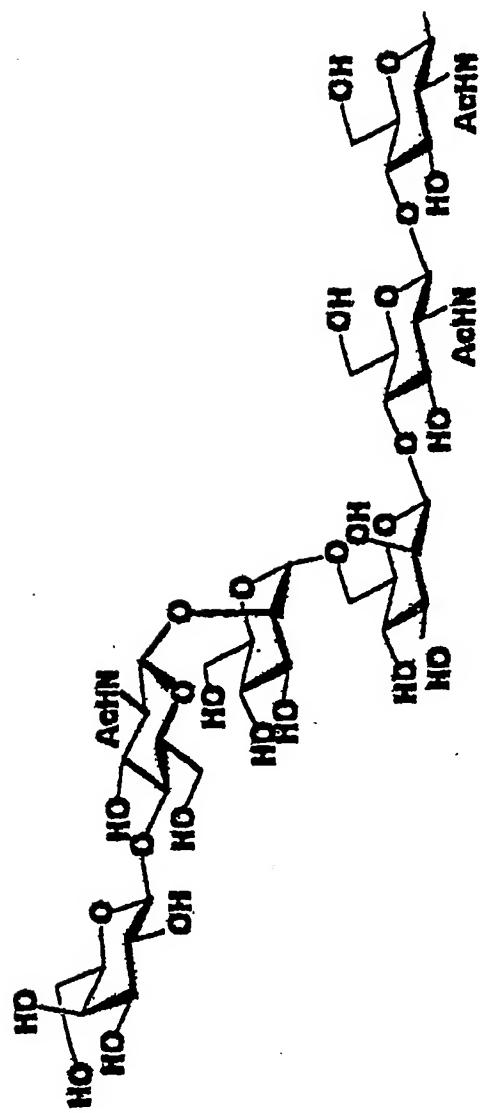
10/4/12



第10図

10/5/12

Asn-Fmoc

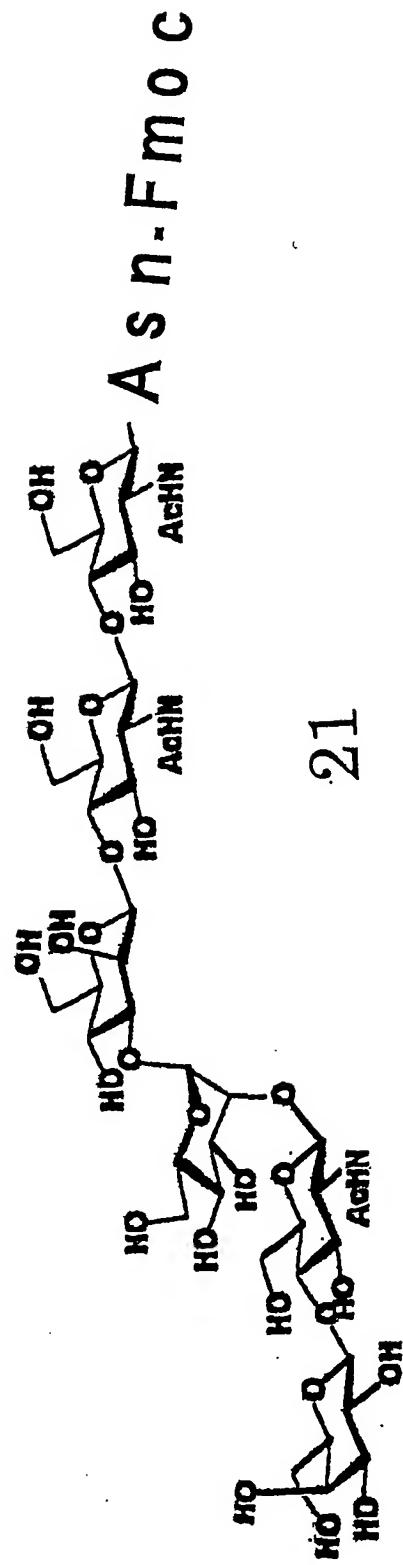


16

第10図

10/6/12

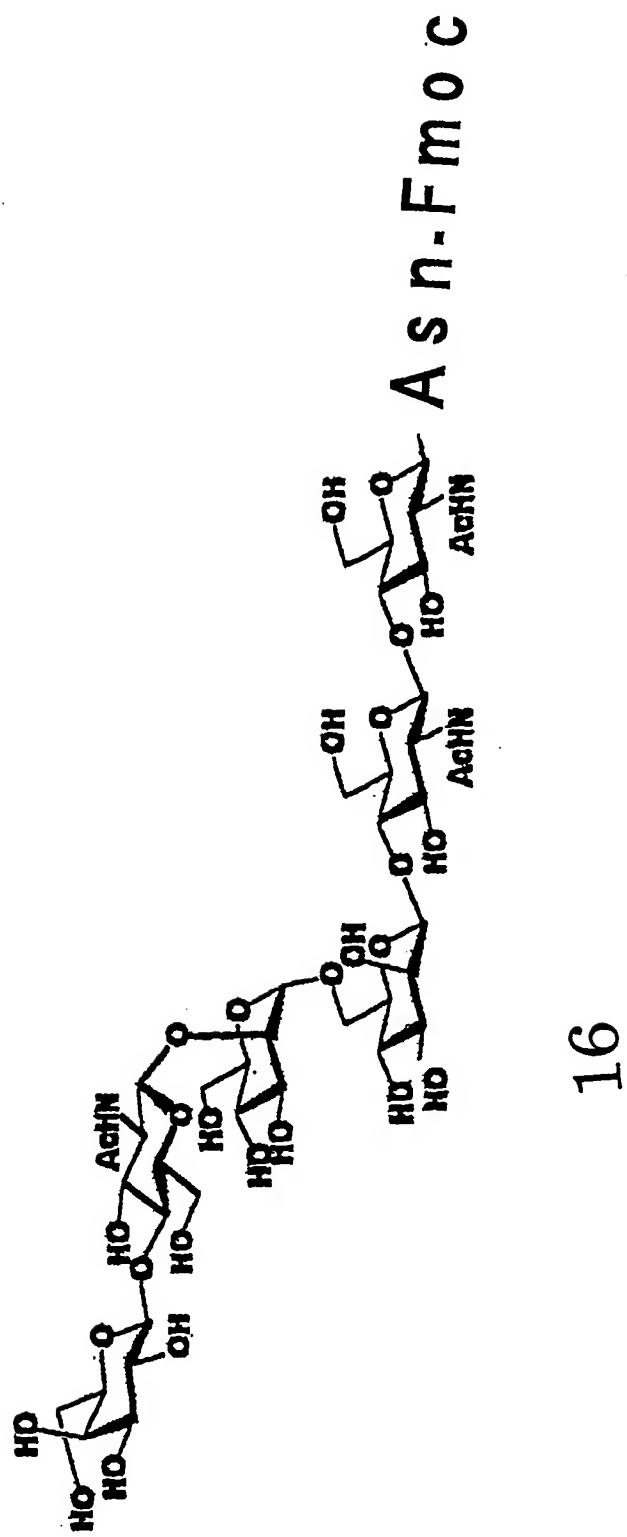
差替え用紙(規則26)



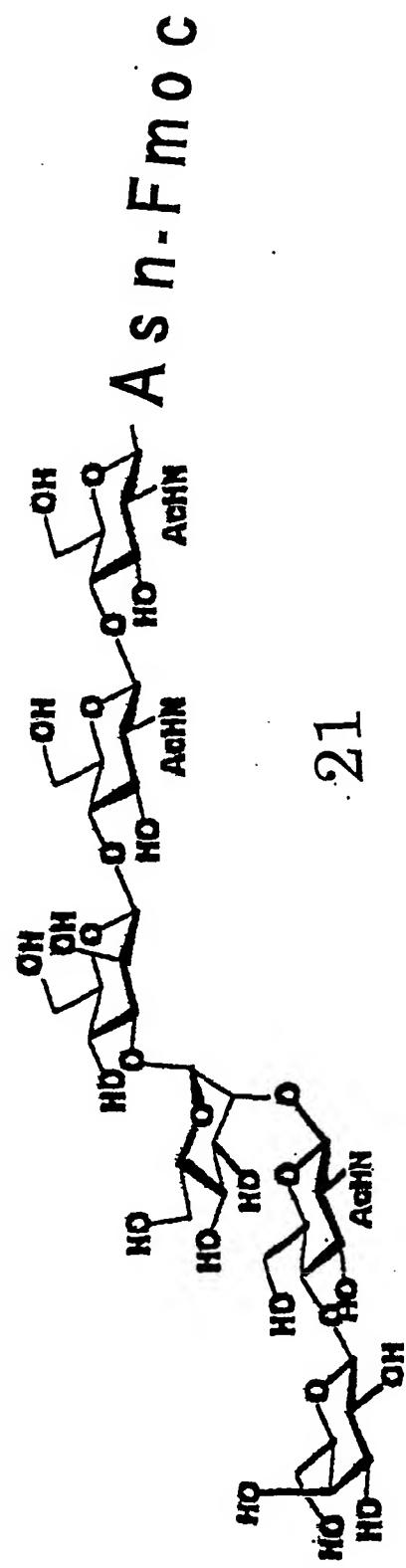
第10回

10/7/12

漫録文用紙(規則26)



第11圖

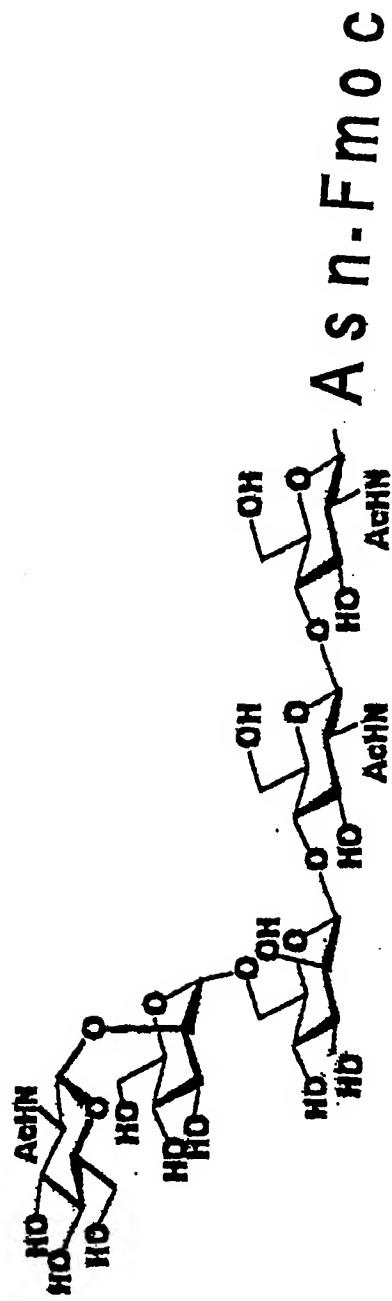


ガラクトース加水分解酵素

第 11 図

11/1/12

差替え用紙(規則26)



四

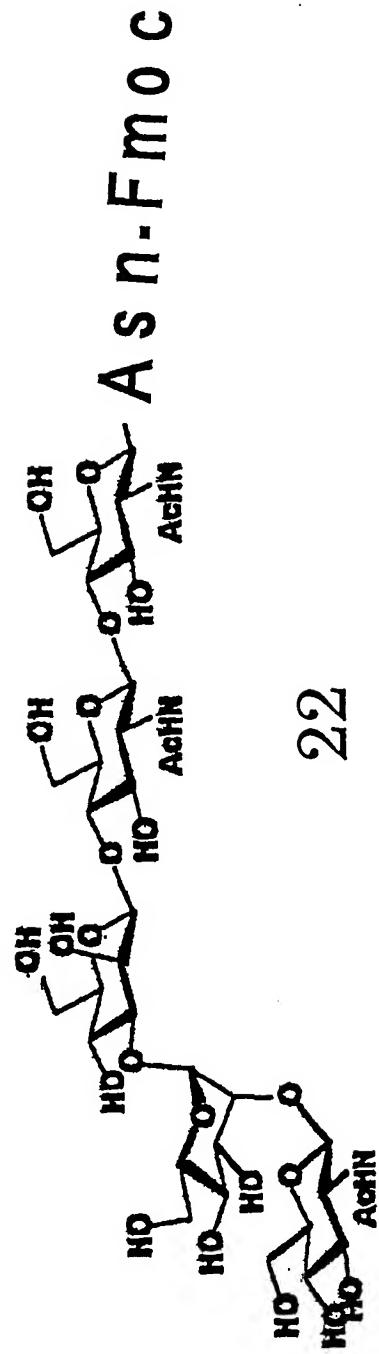
第11図

11/2/12

差替え用紙 (規則26)

N-アセチルグルコサミン加
水分解酵素

22

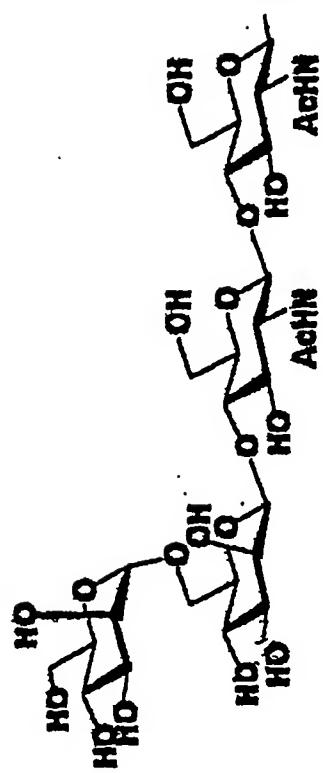


第 11 図

11/3/12

謹 許 用 紙 (規則26)

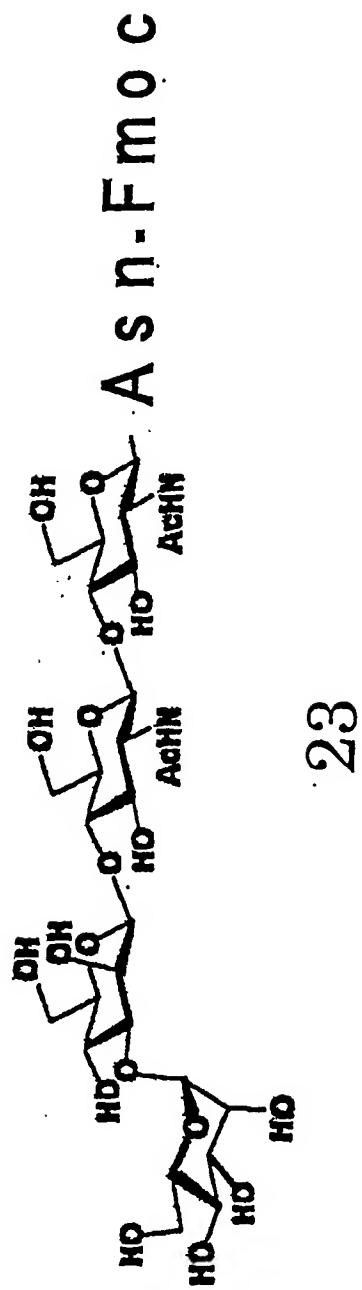
A s n - F m o c



18

第 11 図

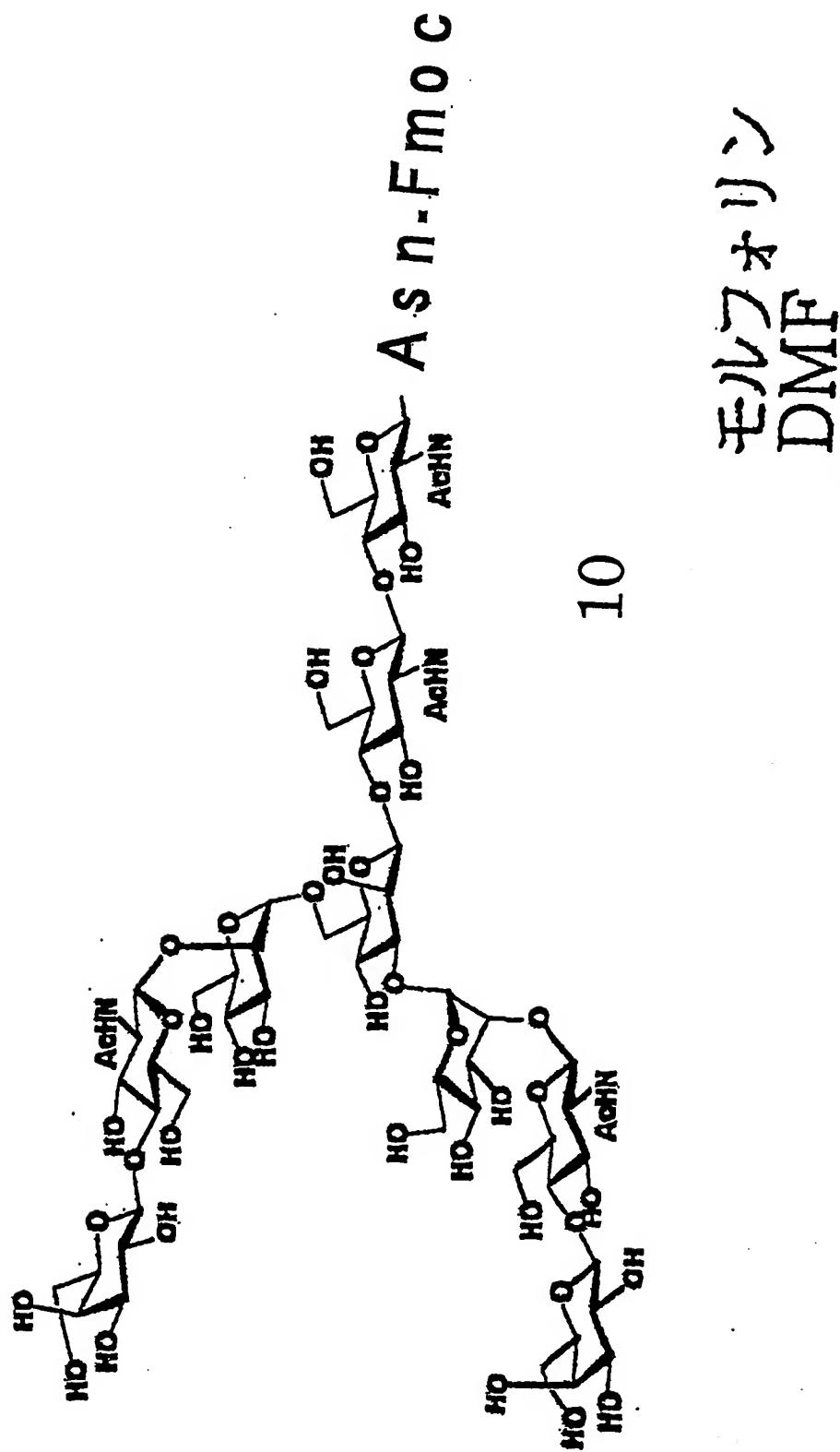
11/4/12
差替え用紙(規則26)



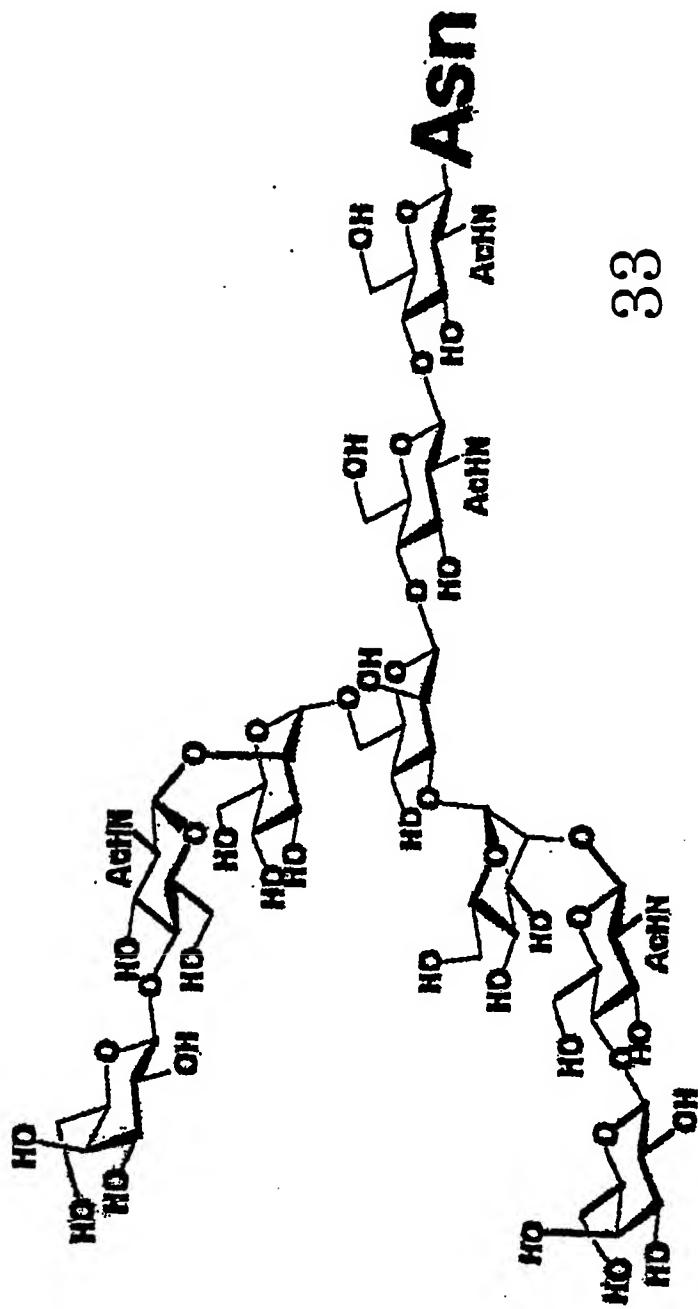
第 11 図

11/5/12

差替え用紙 (規則26)



第12図

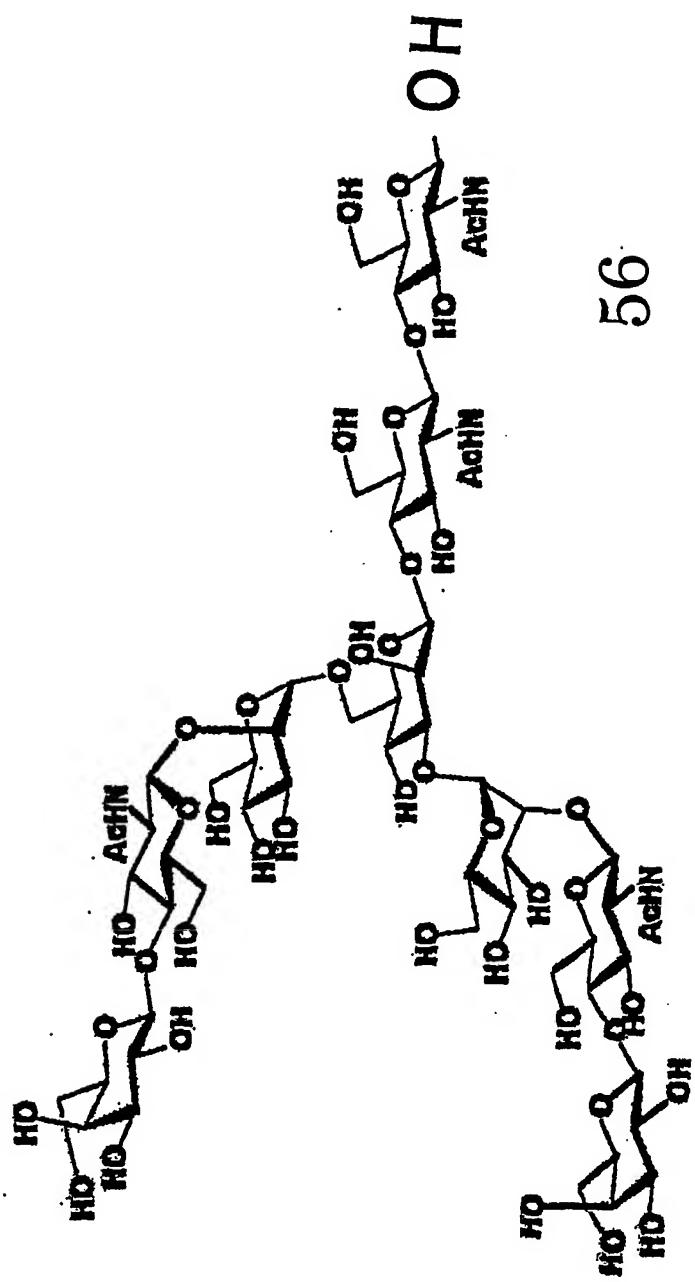


1) ヒドラジン
2) $\text{Ac}_2\text{O}/\text{NaHCO}_3/\text{H}_2\text{O}$

第12図

12/1/12

差替え用紙(規則26)



第 12 図

12/2/12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/06091

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl' C07H15/12, 5/06, 7/027, C08B37/00, C12P13/04, 19/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl' C07H15/12, 5/06, 7/027, C08B37/00, C12P13/04, 19/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

REGISTRY (STN), CAPLUS (STN), CAOLD (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Katsuji HANEDA et al., Transglycosylation of intact sialo complex-type oligosaccharides to the N-acetylglucosamine moieties of glycopeptides by <i>Mucor hiemalis</i> endo- β -N-acetylglucosaminidase, Carbohydrate Research, 1996, Vol.292, pages 61 to 70	1,3,4,6,8, 9,16
Y		2,5,7,10-15, 17
X	JP 7-224082 A (Rikagaku Kenkyusho), 22 August, 1995 (22.08.95), Examples 11, 12 (Family: none)	1,4,6,9,18
X	JP 11-255807 A (The Noguchi Institute), 21 September, 1999 (21.09.99), Examples 1, 2 (Family: none)	1,4

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
26 August, 2002 (26.08.02)Date of mailing of the international search report
10 September, 2002 (10.09.02)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	The Japanese Biochemical Society, Shin Seikagaku Jikken koza 3, Toshitsu I, To Tanpaku-shitsu (jo), Tokyo Kagaku Dojin, 21 May, 1990 (21.05.90), pages 163 to 165	1-17
X	Hiroshi NOMOTO et al., PREPARATION AND CHARACTERISATION OF FRAGMENT GLYCOASPARAGINES FROM OVALBUMIN GLYCOPEPTIDES: REFERENCE COMPOUNDS FOR STRUCTURAL AND BIOCHEMICAL STUDIES OF THE OLIGO-MANNOSE AND HYBRID TYPES OF CARBOHYDRATE CHAINS OF GLYCOPROTEINS, Carbohydrate Research, 1982, Vol.107, pages 91 to 101	18,19
Y		1-17
X	CARLO UNVERZAGT et al., Building Blocks for Glycoproteins: Synthesis of the Ribonuclease B Fragment 21-25 containing an Undecasaccharide N-Glycan, Tetrahedron Letters, 1997, Vol.38, No.32, pages 5627 to 5630	16
X	M. VITTORIA CHIESA et al., Synthesis of an Asparagine-Linked Heptasaccharide-Basic Structure of N-Glycans, Eur. J. Org. Chem. 2000, pages 3541 to 3554	18,19
X	CARLO UNVERZAGT, Chemoenzymatic synthesis of a sialylated diantennary N-glycan linked to asparagine, Carbohydrate Research, 1998, Vol.305, pages 423 to 431	18
X	GREGORY M. WATT et al., The chemoenzymatic synthesis of the core trisaccharide of N-linked oligosaccharides using a recombinant β -mannosyltransferase, Carbohydrate Research, 1998, Vol.305, pages 533 to 541	19
X	JOHN M. MCGUIRE et al., The resolution of the neutral N-linked oligosaccharides of IgG by high pH anion-exchange chromatography, Carbohydrate Research, 1996, Vol.292, pages 1 to 9	19
X	INKA BROCKHAUSEN et al., Control of glycoprotein synthesis. The use of oligosaccharide substrates and HPLC to study the sequential pathway for N-acetylglucosaminyltransferases I, II, III, IV, V, and VI in the biosynthesis of highly branched N-glycans by hen oviduct membranes, BIOCHEM. CELL BIOL., 1988, Vol.66, pages 1134 to 1151	19

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. C1' C07H15/12, 5/06, 7/027, C08B37/00, C12P13/04, 19/04

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. C1' C07H15/12, 5/06, 7/027, C08B37/00, C12P13/04, 19/04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

REGISTRY (STN), CAPLUS (STN), CAOLD (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	KATSUJI HANEDA, et al., Transglycosylation of intact sialo complex-type oligosaccharides to the <i>N</i> -acetylglucosamine moieties of glycopeptides by <i>Mucor hiemalis</i> endo- β - <i>N</i> -acetylglucosaminidase, Carbohydrate Research, 1996, Vol. 292, p. 61-70	1, 3, 4, 6, 8, 9, 16
Y		2, 5, 7, 10-15, 17
X	JP 7-224082 A (理化学研究所) 1995.08.22 実施例 11, 12 を参照 (ファミリーなし)	1, 4, 6, 9, 18

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

26. 08. 02

国際調査報告の発送日

10.09.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

中木 亜希

4 P 9282



電話番号 03-3581-1101 内線 3492

C (続き) . 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
X	JP 11-255807 A (財団法人野口研究所) 1999.09.21 実施例 1, 2 を参照 (ファミリーなし)	1, 4
Y	社団法人日本生化学会、新生化学実験講座3 糖質I 糖タンパク質(上)、株式会社東京化学同人、1990年5月21日、第163-165頁	1-17
X Y	HIROSHI NOMOTO, et al., PREPARATION AND CHARACTERISATION OF FRAGMENT GLYCOASPARAGINES FROM OVALBUMIN GLYCOPEPTIDES: REFERENCE COMPOUNDS FOR STRUCTURAL AND BIOCHEMICAL STUDIES OF THE OLIGO-MANNOSE AND HYBRID TYPES OF CARBOHYDRATE CHAINS OF GLYCOPROTEINS, Carbohydrate Research, 1982, Vol. 107, p. 91-101	18, 19 1-17
X	CARLO UNVERZAGT, et al., Building Blocks for Glycoproteins: Synthesis of the Ribonuclease B Fragment 21-25 containing an Undecasaccharide N-Glycan, Tetrahedron Letters, 1997, Vol. 38, No. 32, p. 5627-5630	16
X	M. VITTORIA CHIESA, et al., Synthesis of an Asparagine-Linked Heptasaccharide - Basic Structure of N-Glycans, Eur. J. Org. Chem., 2000, p. 3541-3554	18, 19
X	CARLO UNVERZAGT, Chemoenzymatic synthesis of a sialylated diantennary N-glycan linked to asparagine, Carbohydrate Research, 1998, Vol. 305, p. 423-431	18
X	GREGORY M. WATT, et al., The chemoenzymatic synthesis of the core trisaccharide of N-linked oligosaccharides using a recombinant β -mannosyltransferase, Carbohydrate Research, 1998, Vol. 305, p. 533-541	19
X	JOHN M. MCGUIRE, et al., The resolution of the neutral N-linked oligosaccharides of IgG by high pH anion-exchange chromatography, Carbohydrate Research, 1996, Vol. 292, p. 1-9	19
X	INKA BROCKHAUSEN, et al., Control of glycoprotein synthesis. The use of oligosaccharide substrates and HPLC to study the sequential pathway for N-acetylglucosaminyltransferases I, II, III, IV, V, and VI in the biosynthesis of highly branched N-glycans by hen oviduct membranes, BIOCHEM. CELL BIOL., 1988, Vol. 66, p. 1134-1151	19